

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Niveles de calcio sérico y su relación con la
presentación de endometritis post puerperal
diagnosticada con Metrichcek® en vacas lecheras de
crianza intensiva de Lima**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Irma Karla Cecilia ARÉVALO RODRÍGUEZ

Lima - Perú

2017

DEDICATORIAS

A mis amados padres, por su amor infinito, su ejemplo de superación y su lucha constante e incansable.

A mis hermanos Carlo y Wheeler, por creer en mí y motivarme con sus palabras y sus logros.

A mis tíos, por su amor y apoyo incondicional desde siempre.

A los amigos logrados en la carrera y a las estupendas personas y amigos que conocí durante el desarrollo de esta etapa.

A mi querida Alma Máter y a las personas que la conforman, por ser parte de mi formación profesional y permitirme sentir orgullosa de pertenecer a esta gran institución.

AGRADECIMIENTOS

A Rocío Sandoval, por su guía constante y aporte invaluable en la realización de este trabajo. Por sus enseñanzas y porque, sin pretenderlo, es ejemplo y motivación.

A los médicos veterinarios, ingenieros zootecnistas, técnicos y practicantes de los establos, por su apoyo, buena disposición, tiempo e información brindados.

A Felipe Ruiz, por su importante contribución y apoyo constante en el presente trabajo. Por las ideas compartidas y los conocimientos transmitidos.

A Alfredo Delgado, por su apoyo y porque mediante su amplio conocimiento y vasta experiencia supo resolver mis dudas.

A Bernardo López, Katherine Choez y Joe Pizarro, por su esfuerzo, compromiso y apoyo desinteresado brindados en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

CONTENIDO

Dedicatorias	ii
Agradecimientos	iii
Índice de contenido	iv
Resumen	vii
Abstract	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
 I. INTRODUCCIÓN	 1
 II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	 3
2.1. Fisiología del Calcio	3
2.1.1. Regulación del calcio	4
2.1.2. Rol del calcio en la contracción del músculo liso	6
2.1.3. Rol del calcio en el sistema inmune	9
2.2. Hipocalcemia	15
2.2.1. Definición	15
2.2.2. Epidemiología	17
2.2.3. Repercusión de los bajos niveles de calcio sobre el desempeño reproductivo y la salud de las vacas lecheras	19
2.3. Fisiología del Puerperio	21
2.3.1. Enfermedades uterinas post parto	24

2.4. Endometritis	25
2.4.1. Definición	25
2.4.2. Epidemiología	27
2.4.3. Diagnóstico	27
2.4.3.1. Palpación transrectal	28
2.4.3.2. Vaginoscopía	29
2.4.3.3. Ultrasonografía	31
2.4.3.4. Citología uterina mediante citocepillo	31
2.4.3.5. Prueba de McDougall	32
2.5. Importancia de la endometritis en el desempeño productivo y reproductivo	36
2.6. La endometritis en el ganado lechero de Lima	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración	38
3.2. Recopilación de datos	38
3.3. Metodología empleada en el estudio	39
3.3.1. Criterios de inclusión de los establos	39
3.3.2. Creación de un banco de suero	39
3.3.2.1. Obtención de muestras de sangre	40
3.3.2.2. Obtención de la muestra de suero	40
3.3.3. Diagnóstico de endometritis	41
3.3.4. Medición de los niveles de calcio	42
3.4. Diseño de estudio	43
3.4.1. Cálculo del tamaño muestral	44
3.4.2. Modelo de estudio	45
3.4.3. Análisis estadístico	46
IV. RESULTADOS	47

V. DISCUSIÓN	53
VI. CONCLUSIONES	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII. ANEXOS	79

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la relación entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en vacas lecheras postparto. El estudio se realizó con 213 vacas lecheras de raza Holstein de 3 establos lecheros de crianza intensiva de la provincia de Lima durante 1 año. Se colectaron muestras de sangre de vacas entre el día 1 y 7 postparto. El diagnóstico de endometritis fue realizado el día 35 ± 3 postparto empleando el dispositivo Metrichcek y de acuerdo al Score McDougall. Las vacas con Score mayor a 1 fueron positivas a endometritis. Se excluyeron del estudio las vacas que murieron antes del diagnóstico de endometritis, vacas que presentaron distocia, partos dobles o mortinatos, retención de placenta, metritis puerperal, hipocalcemia clínica o patologías diferentes al de interés y vacas que fueron tratadas con calcio. El análisis del calcio sérico de las vacas seleccionadas se realizó mediante el empleo de un espectrofotómetro y de un kit de diagnóstico de calcio. El punto de corte determinado mediante análisis de característica operativa del receptor – ROC (NCa vs. Endometritis) fue de 7.44 mg/dl. En el análisis de regresión logística se consideraron las variables independientes: estación del año, paridad y nivel de calcio (NCa); y la variable dependiente: endometritis. Se determinó que las vacas con bajo NCa (<7.44 mg/dl) durante la primera semana postparto tienen mayor riesgo de presentar endometritis comparado con las vacas con alto NCa (>7.44 mg/dl) (OR ajustado=2.58; $p<0.05$). Las vacas primerizas tienen mayor riesgo de presentar endometritis comparado con vacas multíparas (OR ajustado=8.08; $p<0.05$). Las vacas que parieron en invierno tienen mayor riesgo de presentar endometritis comparado con vacas que parieron en verano (OR ajustado=2.36; $p<0.05$). El estudio demuestra que el NCa (<7.44 mg/dl) es un factor de riesgo en la presentación de endometritis en vacas lecheras post parto ($p<0.05$).

Palabras clave: Nivel de calcio, endometritis, vacas lecheras, post parto, Lima

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the relationship between serum calcium levels and the presentation of endometritis in post-partum dairy cows. The study included 213 Holstein dairy cows from 3 intensive dairy farms in the province of Lima for 1 year. Cows blood samples were collected between the first and seventh postpartum days. The diagnosis of endometritis was made at 35th \pm 3 day postpartum, using the Metrichick device and the McDougall score. Cows with a McDougall Score greater than 1 were considered positive for endometritis. We excluded cows that died before the diagnosis of endometritis, cows with dystocia, double births or stillbirths, placental retention, puerperal metritis, clinical hypocalcemia and those that were treated with calcium or had another pathologies. The analysis of serum calcium from selected cows was done by spectrophotometer. ROC cut-off point (Calcium level vs. Endometritis) was 7.44 mg/dl and we defined high or low calcium levels considering this value. Logistic regression considered season of the year, parity and calcium levels as independent variables; and endometritis as dependent variable. We determined that cows with low (<7.44 mg/dl) calcium levels during the first week post-partum had a higher risk to develop endometritis compared with cows with high (>7.44 mg/dl) calcium levels (adjusted OR = 2.58; $p < 0.05$). Primiparous cows were at higher risk of endometritis (adjusted OR = 8.08; $p < 0.05$) compared to multiparous cows. Cows that gave birth in winter were at higher risk of endometritis (adjusted OR = 2.36, $p < 0.05$) compared to cows that gave birth in the summer. The study concludes that low serum calcium level (<7.44 mg / dl) is a risk factor in the presentation of endometritis in post-partum dairy cows ($p < 0.05$).

Key words: Calcium level, endometritis, dairy cows, post partum, Lima

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1.	Score descrito por McDougall realizado para el diagnóstico de endometritis.	35
Cuadro 2.	Tabla de contingencia entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en vacas lecheras de Lima.	49
Cuadro 3.	Resultados del análisis de regresión logística para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras según estación de parto, paridad y nivel de calcio en los establos lecheros de Lima.	50
Cuadro 4.	Valor pronóstico, odds, % de endometritis e intervalo de confianza al 95% según el modelo de regresión logística obtenido para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras en los establos de Lima.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
Figura 1.	Distribución del calcio en el organismo.	4
Figura 2.	Hormonas encargadas de la regulación del calcio.	5
Figura 3.	Mecanismos para incrementar el $[Ca^{2+}]$ intracelular en el músculo liso.	8
Figura 4.	Cadena de reacciones producto del aumento de Ca^{2+} intracelular.	9
Figura 5.	Proceso de entrada de Ca^{2+} de entrada almacenada (SOCE).	11
Figura 6.	Rol del SOCE en la activación del NADPH oxidasa en la fagocitosis.	12
Figura 7.	Respuesta homeostática del calcio en la vaca al inicio de la lactación.	16
Figura 8.	Relación entre el número de lactaciones y la prevalencia de la hipocalcemia subclínica en muestras recolectadas dentro de las 48 horas post parto.	19
Figura 9.	Metrichcek™ (Simcrotech, Hamilton, New Zealand; www.simcrotech.co.nz).	33
Figura 10.	Gráfico del análisis ROC de la relación entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en las vacas lecheras (Nivel de Ca vs. Endometritis) y línea de no-discriminación.	47
Figura 11.	Índice de Youden resultante de la relación entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en las vacas lecheras.	48

I. INTRODUCCIÓN

Un establo lechero se sostiene en base a cuán rápido logra preñar sus vacas; cuando las vacas se demoran en preñar, se retrasan los partos y no se genera un flujo adecuado de vacas en lactación, lo cual puede ser causa de desmedro productivo del establo. Los ganaderos saben que la eficiencia reproductiva de un hato lechero es un componente importante de la rentabilidad en sus establos (Bisinoto *et al.*, 2012), sin embargo, la eficiencia reproductiva sigue siendo un punto débil en la industria. Diversos estudios reportan bajas tasas de concepción al primer servicio (Pryce *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2009; Dillon *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2008) y bajas tasas de servicio en los establos lecheros del Perú y del mundo (Sandoval *et al.*, 2016; Caraviello *et al.*, 2006)

Se sabe que la etapa post parto de la vaca lechera es un periodo muy importante debido a que en esta etapa se presentan una serie de eventos que preparan al animal para una siguiente concepción (Bajcsy *et al.*, 2005; Noakes, 2009). Sin embargo, durante esta etapa se presenta una serie de alteraciones que pueden poner en riesgo la eficiencia reproductiva del animal, tales como distocias, retenciones de membranas fetales, hipocalcemias, cetosis, entre otros. Se ha comprobado que las enfermedades uterinas afectan el restablecimiento del aparato reproductivo y generan un efecto negativo en el desempeño

reproductivo del animal (Heppelmann *et al.*, 2015; Noakes, 2009). Estas alteraciones en el útero extienden el periodo parto-concepción, aumentan el número de inseminaciones por concepción (Gilbert *et al.*, 2005, Kim y Kang, 2003) e incrementan la tasa de sacrificio (LeBlanc *et al.*, 2002, Gilbert *et al.*, 2005).

Una de las enfermedades uterinas de mayor importancia que afectan a las vacas lecheras es la endometritis. A pesar que esta alteración es descrita como la forma menos severa de enfermedad uterina; causa subfertilidad e infertilidad aún después de la resolución de la enfermedad (Herath *et al.*, 2006). He ahí su importancia, ya que existe la necesidad de evaluar factores que podrían estar relacionados a su presentación. Algunos estudios evidencian que existe una asociación entre los niveles de calcio sérico post parto y la presentación de enfermedades uterinas.

Esta asociación se plantea debido a que el calcio es un elemento que interviene en numerosas funciones fisiológicas, entre ellas la contracción muscular (Goff, 2010) y la actividad del sistema inmune (Kimura *et al.*, 2006). Todas las vacas lecheras presentan niveles bajos de calcio en los primeros días post parto (Harris, 1981), debido a la gran demanda de calcio generado por la producción de calostro y leche. Se ha demostrado que estos niveles bajos de calcio aumentan el riesgo de presentación de enfermedades como desplazamiento de abomaso a la izquierda (Goff, 2008), metritis (Martinez *et al.*, 2012) e incluso generan un aumento en el número de animales destinados a saca en la lactancia temprana (LeBlanc *et al.*, 2002a; Gilbert *et al.*, 2005; Duffield, 2006). Esto conlleva a la necesidad de investigar si los niveles de calcio durante la etapa temprana post parto son un factor de riesgo para la presentación de endometritis. Por lo tanto, el presente trabajo tiene la finalidad de investigar la relación existente entre los niveles de calcio sérico y la presentación de endometritis en los establos lecheros de crianza intensiva de Lima.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fisiología del calcio

El calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo, representando aproximadamente el 1,5% del peso corporal. Numerosas funciones fisiológicas como la contracción muscular, la secreción de las hormonas, la activación enzimática, la división celular, la estabilidad de la membrana celular, la excitabilidad neuromuscular y la coagulación de la sangre son dependientes del calcio (Goff, 2010).

La mayor proporción de calcio se encuentra en los huesos (99%) y solamente el 1% restante se encuentra en la membrana celular, la mitocondria, el retículo endoplásmico y el fluido extracelular (Costanzo, 2000). La concentración de calcio en el plasma es de 10 mg/dl. Aproximadamente el 5% se encuentra formando complejos con aniones (citrato, bicarbonato, fosfato y lactato), el 40% se encuentra unido a proteínas y el 55% del calcio se encuentra en forma libre o iónico (figura 1) (Guyton y Hall, 2008), el cual cumple la función fisiológica en el organismo (Goff, 2010).

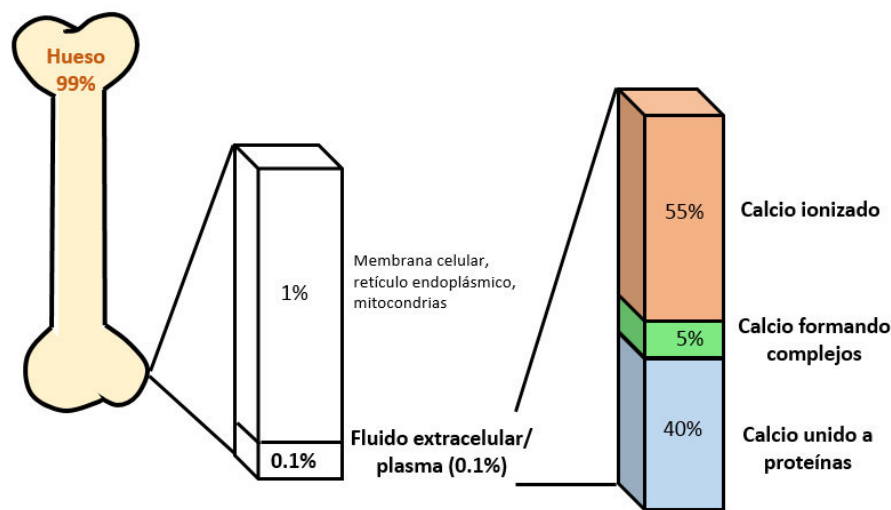


Figura 1. Distribución del calcio en el organismo. Fuente: Guyton y Hall, 2011.

2.1.1. Regulación del calcio

Las concentraciones de calcio iónico extracelular son reguladas por un sistema que incluye tres hormonas, tres sistemas corporales y un receptor sensible a calcio (CaR) (Goff, 2010). Cuando estos procesos regulatorios funcionan en equilibrio se mantiene la homeostasis del calcio.

Las hormonas encargadas de la regulación del calcio son (figura2): a) hormona paratiroidea (PTH), b) calcitonina y c) vitamina D3 activa o calcitriol (1,25-(OH)₂ D3). A su vez, los sistemas corporales están conformados por el sistema renal (riñones), sistema gastrointestinal (intestino) y sistema óseo (huesos) (Goff, 2010).

El CaR se encuentra en la glándula paratiroidea, posee siete dominios transmembrana acoplados a una proteína G y se activa con los cambios de concentración del Ca extracelular. La activación de CaR inhibe la secreción de PTH y estimula la secreción de calcitonina, dependiendo de las concentraciones del calcio sérico (Goff, 2010).

Cuando las concentraciones de calcio sérico disminuyen por debajo de 10 mg/dl, se genera la estimulación del CaR de la glándula paratiroidea. El estímulo de dicha glándula promueve la formación y liberación de la PTH. El incremento de la PTH en sangre actúa de las siguientes maneras: a) estimula la absorción renal de Ca mediante la bomba Ca/ATPasa, b) promueve la resorción ósea a través del aumento de la actividad de los osteoclastos y c) estimula la conversión de Calcidiol (25 hidroxicalciferol) a calcitriol (1,25-(OH)2D3) en el riñón, mediante la acción de la 1alfa hidroxilasa.

El calcitriol (1,25-(OH)2D3) circulante en sangre incrementa la captación de Ca a nivel intestinal mediante la activación de la calbindina, proteína de unión al calcio (Guyton y Hall, 2008). La concentración de calcitriol en sangre requerida para producir un aumento significativo en el transporte de calcio a nivel intestinal se genera dentro de 24 horas del inicio de estimulación de la PTH. A su vez, la resorción ósea se genera luego de 48 horas post estimulación de la PTH. Cuando las respuestas de adaptación de estos mecanismos compensatorios se prolongan, se presenta la hipocalcemia clínica o fiebre de la leche (Harris, 1981).

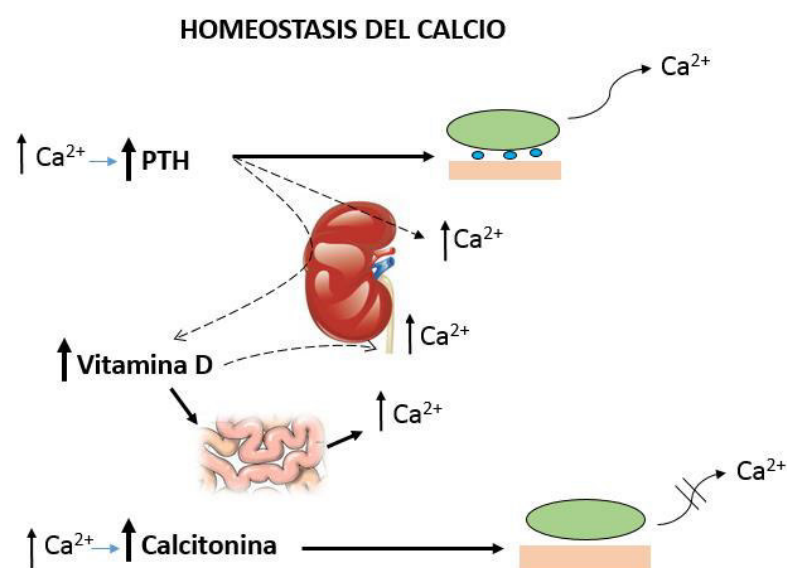


Figura 2. Hormonas encargadas de la regulación del calcio. Fuente: Goff. 2010.

Por otro lado, cuando las concentraciones de Ca se incrementan, los CaR de la glándula paratiroidea inhiben la secreción de PTH y estimulan la secreción de calcitonina, de modo que se genere la homeostasis del calcio (Goff, 2010).

Es necesario mencionar que durante el periodo de seca de la vaca lechera los mecanismos de compensación no responden adecuadamente y todas las vacas presentan niveles bajos de calcio sérico en los primeros días post parto (Harris, 1981). Esto se debe a que los órganos que responden al aumento en la demanda de calcio no se adaptan inmediatamente, razón por la cual la homeostasis del calcio no ocurre hasta varios días después del parto (Andresen, 2001).

Además, existen factores que alteran la homeostasis del calcio y predisponen a la presentación de la hipocalcemia. La alcalosis metabólica genera un cambio conformacional en los receptores de la PTH. Por consiguiente, provoca la disminución de la sensibilidad a la PTH que impide la resorción osteoclástica, la reabsorción renal de calcio y la conversión de Calcidiol a calcitriol, lo cual limita la absorción intestinal del calcio dietario. La alcalosis metabólica es una alteración en el equilibrio ácido base y puede deberse a dietas con una diferencia catión aniónico positiva generado por un exceso de cationes de fácil absorción como el potasio y el sodio (Andresen, 2001; Goff, 2010).

2.1.2. Rol del calcio en la contracción del músculo liso

El músculo liso es un componente importante de los órganos huecos del organismo (Walsh, 2011) tales como el tracto intestinal, el abomaso, el rumen, el útero, la vejiga, entre otros (Salido, 1996). Estas células tienen la capacidad de generar la contracción y relajación de las paredes de dichos órganos (Hill *et al.*, 2011; Walsh, 2011). Esta

capacidad le permite realizar cambios dinámicos en el diámetro luminal de los órganos y controlar una amplia gama de procesos fisiológicos (Hill *et al.*, 2011; Walsh, 2011). Estos procesos comprenden el flujo de sangre, la continencia urinaria, el parto, la digestión, entre otros (Walsh, 2011).

El músculo liso se clasifica, según el acoplamiento eléctrico de las células, como multitudinario o unitario. El músculo liso unitario posee uniones brecha entre células, las cuales son vías de baja resistencia para el flujo de corriente que permite el acoplamiento eléctrico intercelular. A través de las uniones brecha, los potenciales de acción se propagan de manera simultánea en las células y se genera una contracción coordinada de todo el órgano (Costanzo, 2000). El músculo liso unitario se encuentra en órganos tales como los vasos sanguíneos, los intestinos, la vejiga urinaria, uréteres, vías respiratorias, vasos linfáticos, el pene y útero (Costanzo, 2000; Hill *et al.*, 2011).

La contracción muscular es un proceso altamente regulado, que depende de la concentración de calcio libre en el citoplasma (Reyes y Zarain, 2006). En la despolarización de la membrana, el ingreso de Ca a las células del músculo liso se realiza mediante tres vías (figura 3): a) canales de Ca dependientes de voltaje (principal vía), b) canales controlados por ligandos en la membrana sarcolémica y c) mediante la liberación de las reservas de Ca desde el retículo sarcoplásmico por mecanismos controlados por receptores como el indositol trifosfato (IP3) (Costanzo, 2000) y la rianodina (RyR) (Hill *et al.*, 2011).

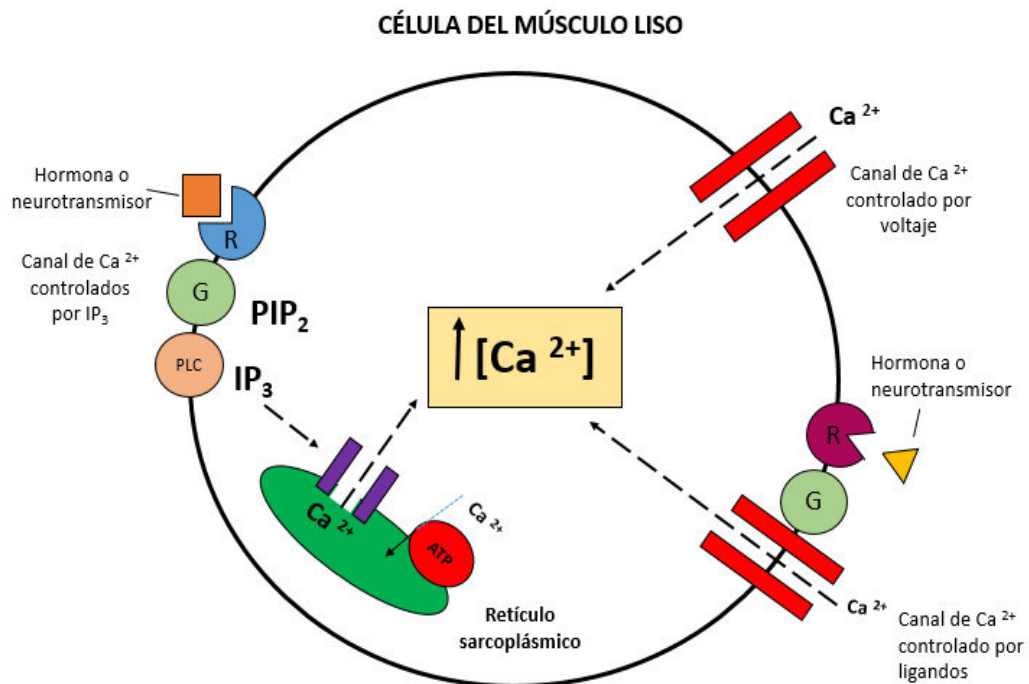


Figura 3. Mecanismos para incrementar el $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular en la célula del músculo liso. (ATP, trifosfato de adenosina; G, proteína unida a GTP, IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-difosfato; PLC, fosfolipasa; R, receptor para hormona o neurotransmisor). Fuente: Costanzo, 2000.

La contracción del músculo liso se inicia debido a la activación de los canales de Ca^{2+} (Reuter 1979; Tsien 1983; Bers 2002). La activación de los canales de Ca^{2+} genera directamente el aumento de la concentración citoplasmática del calcio e indirectamente activa los receptores de Rianodina (Reuter 1979; Tsien 1983; Bers 2002) y estimula la liberación de calcio proveniente del retículo sarcoplásmico (Catterall, 2011). Cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular saturan los sitios de unión restantes de Calmodulina, se induce un cambio conformacional, que se traduce en la activación de la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (Walsh, 2011). Esta enzima genera la fosforilación de la miosina, lo cual desencadena el ciclo de puente cruzado (cycling crossbridge) y la consiguiente contracción muscular (figura 4) (Allen y Walsh, 1994).

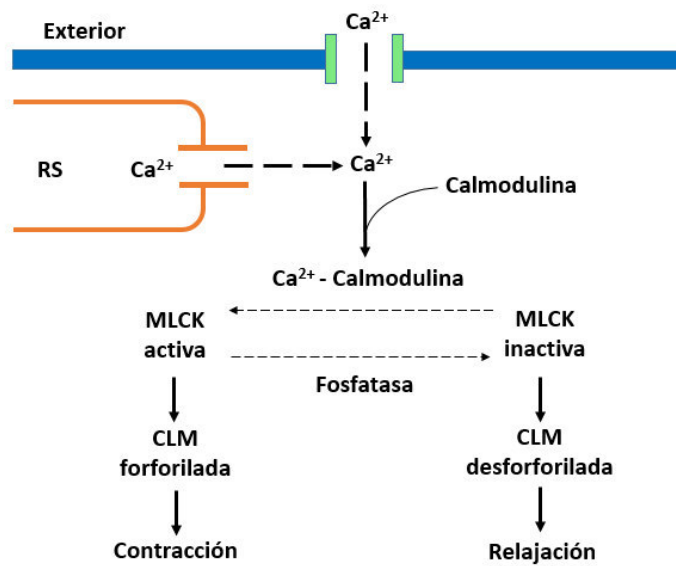


Figura 4. Cadena de reacciones producto del aumento de Ca^{2+} intracelular. (MLCK, miosina cinasa de cadena ligera; CLM, cadena ligera de miosina; RS, retículo sarcoplásmico). Fuente: Guyton y Hall, 2012.

Cuando la concentración de calcio en sangre se encuentra disminuida se reduce la contracción del músculo liso (Goff, 2008) y se afecta negativamente la motilidad del rumen, del abomaso, del útero y del esfínter del pezón (Goff, 2010).

2.1.3. Rol del calcio en el sistema inmune

En la etapa post parto, el sistema inmune innato es el mecanismo predominante encargado de la defensa temprana del útero en involución y es facilitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Hammon *et al.*, 2006). De los PMN, los neutrófilos son la primera línea de defensa contra los patógenos en los procesos infecciosos (Nathan, 2006).

La acción de los neutrófilos en la eliminación de los patógenos invasores se da mediante la fagocitosis, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las trampas extracelulares de neutrófilos (NET's). Los dos primeros se complementan con

péptidos antimicrobianos y enzimas proteolíticas presentes en las vacuolas (Burgos *et al.*, 2011), mientras que los NET's son un mecanismo adicional de eliminación de los patógenos extracelulares (Brinkmann *et al.*, 2004; Brinkmann y Zychlinsky, 2007 y Fuchs *et al.*, 2007).

La acción de los neutrófilos, depende de un adecuado reclutamiento y una adecuada activación de los mismos. Estos dos procesos son considerados puntos críticos durante las primeras etapas de la infección (Hill *et al.*, 1984). Ambos procesos están controlados por la acción de quimiocinas como el factor activador de plaquetas (PAF), el complemento 5a (C5a), el leucotrieno B4 (LTB4) y la interleucina (IL-8). Estas quimiocinas ejercen su función a través de receptores acoplados a proteína G en la membrana plasmática (Boulay *et al.*, 1997). La variación de las concentraciones de calcio intracelular es un evento de vital importancia para que se produzca un adecuado reclutamiento y activación de los neutrófilos (Burgos *et al.*, 2011).

El aumento de la concentración de calcio intracelular es uno de los primeros eventos durante el proceso de activación de los neutrófilos (Burgos *et al.*, 2011). El calcio intracelular aumenta debido a la liberación espontánea de Ca desde los almacenes intracelulares (retículo endoplásmico), mediante tres mecanismos. Los mecanismos son: ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico, Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) y del aumento del influjo de [Ca²⁺] a través de la membrana plasmática (Burgos *et al.*, 2011). Posteriormente, esta disminución de la concentración de Ca²⁺ en el retículo endoplásmico, activa los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática, con la finalidad de adquirir nuevas reservas.

Este proceso retrógrado es denominado "entrada de Ca^{2+} + de entrada almacenada" (SOCE por su sigla en inglés, *store operated calcium entry*. Figura 5) (Parekh y Putney, 2005).

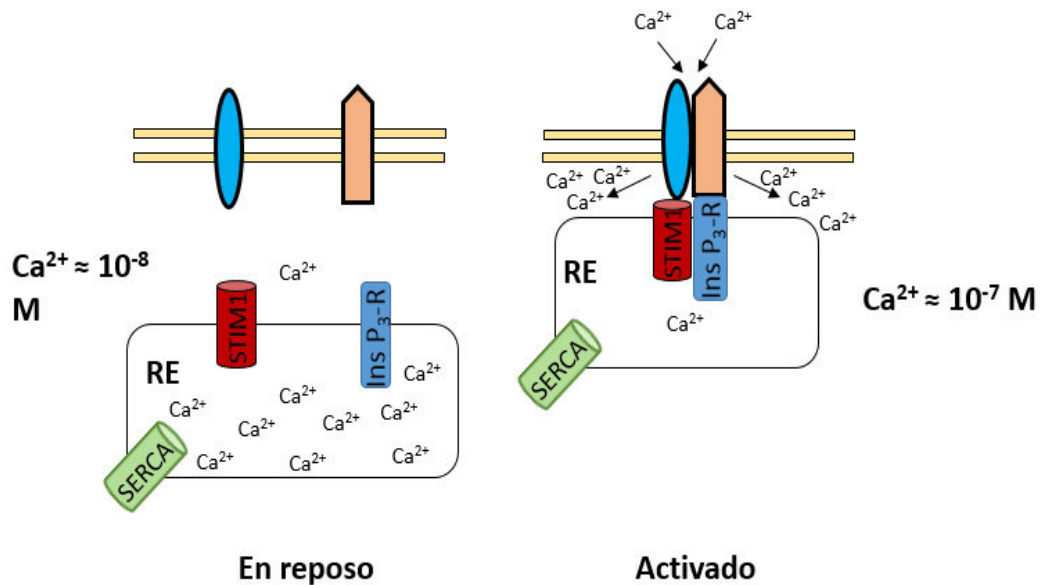


Figura 5. Proceso de entrada de Ca^{2+} de entrada almacenada (SOCE). (InsP₃R, receptor del inositol 1,4,5-trifosfato; RE, retículo sarcoplásmico; SERCA (sarco-endoplasmic reticulum adenosine triphosphatase), ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico; STIM1 (stromal interaction molecular), proteína de recaptación de calcio). Fuente: Burgos *et al.*, 2011.

El proceso de regulación de Ca (SOCE) controla una amplia variedad de funciones celulares, tales como la proliferación celular, la muerte celular y la actividad enzimática como de la adenilil ciclasa y la óxido nítrico sintasa constitutiva (Parekh y Putney, 2005). Además, controla el estallido respiratorio, la degranulación y la motilidad de los neutrófilos (Hallett *et al.*, 1990, Kankaanranta *et al.*, 1995, Steinckwich *et al.*, 2007, Tarlowe *et al.*, 2003).

El estallido respiratorio es un proceso esencial de la función biocida de los neutrófilos. Este es un mecanismo dependiente de oxígeno mediante el cual el neutrófilo genera

especies reactivas de oxígeno tales como, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y ácido hipocloroso ($HOCl$) (Nathan, 2006). Una de las principales fuentes de producción de ROS se da mediante la activación del sistema de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (figura 6) (Nathan, 2006). La NADPH oxidasa activada produce O_2^- en el fagosoma, el cual es el compuesto básico para la formación de H_2O_2 mediante el que se genera el $HOCl$ (Nathan, 2006; Segal, 2005; Smith, 1994). Es necesario mencionar que el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la producción de O_2^- intracelular (Granfeldt *et al.*, 2002). Un estudio concluyó que el aumento de Ca^{2+} inducido experimentalmente es suficiente para conseguir una producción intracelular adecuada de radicales de oxígeno (Dahlgren *et al.*, 1992).

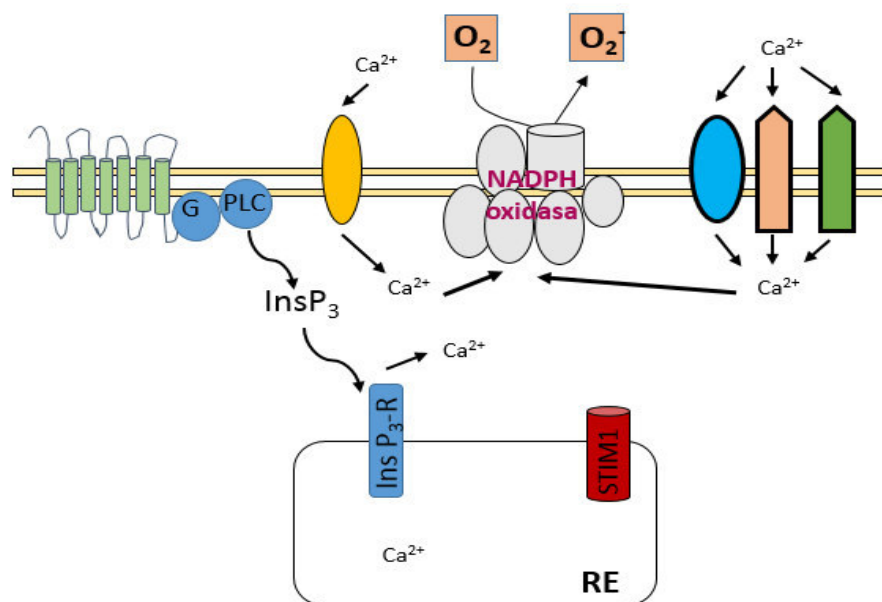


Figura 6. Rol del SOCE en la activación del NADPH oxidasa en la fagocitosis. (NADPH, sistema de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; $InsP_3$, inositol 1,4,5-trifosfato; $InsP_3R$, receptor del inositol 1,4,5-trifosfato; RE, retículo sarcoplásmico; PLC, fosfolipasa; G, Proteína unida a GTP; STIM1 (stromal interaction molecular), proteína de recaptación de calcio). Fuente: Burgos *et al.*, 2011.

Además, el incremento de Ca^{2+} intracelular está involucrado en la liberación de la mieloperoxidasa al momento de la degranulación neutrofílica. La acción de la mieloperoxidasa permite que el H_2O_2 oxide al Cl^- y se forme el HOCl , principal arma de los neutrófilos contra los microbios (Nathan, 2006; Segal, 2005; Smith, 1994).

La degranulación neutrofílica es otro proceso importante en la acción bactericida del neutrófilo. Los neutrófilos contienen gránulos implicados en la destrucción intracelular de microorganismos (Rausch y Moore, 1975; Gennaro *et al.*, 1983; Baggiolini *et al.*, 1985). Estos gránulos son de tres tipos: azurófilos, específicos o secundarios y terciarios (Rausch y Moore, 1975; Gennaro *et al.*, 1983; Baggiolini *et al.*, 1985). El proceso de degranulación neutrofílica se genera por el aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular inducido por quimiocinas como la N-formil metionil leucil fenilalanina (fMLP) (Lew *et al.*, 1986).

Se ha demostrado experimentalmente que cuando se impide el aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular, mediante la acción de quelantes, se produce una falla en el proceso de degranulación. El cual puede ser inducido mediante la estimulación del influjo de Ca^{2+} (Niessen *et al.*, 1991). Aunque las moléculas diana específicas para el Ca^{2+} en el proceso de degranulación de los neutrófilos aún no han sido identificados (Lacy, 2006), estos datos sugieren que la inhibición de SOCE altera la degranulación neutrofílica y reduce su eficiencia durante el proceso inflamatorio (Burgos *et al.*, 2011).

Además, los cambios en el pH intracelular (pH_i) tienen un papel crítico en el proceso inflamatorio (Sandoval *et al.*, 2007). Funciones como el comportamiento microbicida, la migración celular, la generación de oxidante intracelular, la citotoxicidad de células tumorales y la exocitosis de gránulos azurófilos, son dependientes del pH (Roos y Boron, 1981, Simchowicz y Cragoe, 1986; Trevani *et al.*, 1999). Estos cambios en el pH_i son

inducidos por quimiocinas tales como fMLP, LTB₄, PAF, C5a (Hidalgo *et al.*, 2004; Osaki *et al.*, 1989, Simchowicz, 1985) y el Ca²⁺ (Bankers-Fulbright *et al.*, 2004).

Estudios proponen que el CA²⁺ está implicado en los cambios de pHi en los hepatocitos, plaquetas y eosinófilos (Bankers-Fulbright *et al.*, 2004; Gende, 2003; Martin-Requero *et al.*, 1997). Otro estudio demostró que la inhibición de la entrada de calcio redujo la alcalinización intracelular inducida por PAF y que los supuestos inhibidores de SOCE interfirieron con el aumento de pHi, afectando vías de señalización (PI3K-ERK1/2) en los neutrófilos bovinos (Sandoval *et al.*, 2007).

Finalmente, estudios reportan que la inhibición de la afluencia de calcio reduce la respuesta de PAF (Conejeros *et al.*, 2010; Sandoval *et al.*, 2007) y otros agentes proinflamatorios en neutrófilos, tales como LTB₄ (Salmon y Ahluwalia, 2010), C5a (Dore *et al.*, 1990, Monk y Partridge, 1993) o IL-8 (Schaff *et al.*, 2008).

En resumen, el Ca intracelular es un mensajero secundario implicado en el control de procesos como la formación de NET, la generación de ROS, la liberación de gránulos, los cambios en el pH intracelular, así como en la expresión de citoquinas en la mayoría de las células del sistema inmunológico, incluyendo neutrófilos (Burgos *et al.*, 2009; Palić *et al.*, 2007). Considerando el importante rol que desempeña el calcio en el sistema inmune, es de suponer que los niveles bajos de calcio en la etapa post parto causan inmunosupresión, el cual se genera por el agotamiento del almacenamiento de Ca a nivel intracelular (Kimura *et al.*, 2006). De modo que, cuando las reservas de calcio son insuficientes, la respuesta de las células inmunitarias a los estímulos activadores se atenúa.

2.2. Hipocalcemia

2.2.1. Definición

La hipocalcemia es un trastorno metabólico del post parto temprano, en el cual los mecanismos homeostáticos del animal no logran mantener las concentraciones normales de Ca en sangre (Goff y Horst, 1997). Esta alteración ocurre debido a la gran demanda de calcio (entre 20 a 30 g de calcio al día) al inicio de la lactación y a la incapacidad del animal para aumentar la movilización de calcio mediante la resorción ósea y la absorción intestinal (figura 7) (Goff, 2010).

La hipocalcemia puede presentarse de dos formas, una presentación clínica y otra subclínica. Se considera que un animal presenta hipocalcemia subclínica cuando la concentración sérica de Ca se encuentra entre 5.5 and 8.0 mg/dl (Goff, 2008). La hipocalcemia subclínica no presente signos clínicos (Goff, 2010). Casi el 50% de las vacas de producción lechera experimentan una hipocalcemia subclínica dentro de las 24 horas post parto (Goff, 2010). Si bien, esta enfermedad no manifiesta signos clínicos, la hipocalcemia subclínica produce una disminución de la contractilidad ruminal y abomasal, lo cual reduce la ingesta de alimento (Goff, 2010). Así también, la hipocalcemia subclínica afecta negativamente la contractilidad uterina y del esfínter del pezón, lo que contribuye a la presentación de metritis, mastitis, y retención de placenta (Goff, 2010).

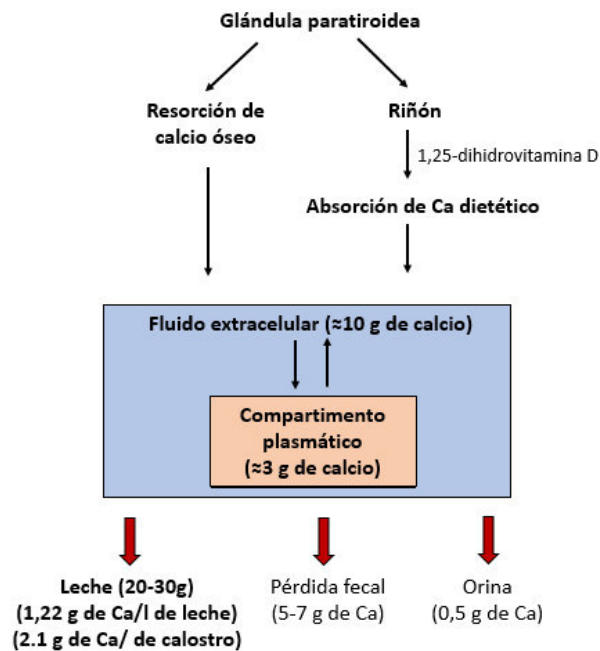


Figura 7. Respuesta homeostática del calcio en la vaca al inicio de la lactación.
Fuente: Goff, 2010.

La hipocalcemia clínica, denominada comúnmente fiebre de la leche o paresia puerperal y se presenta cuando los niveles de calcio sérico se encuentran por debajo de 5 mg/dl (Goff, 2010). Esta alteración se presenta comúnmente en el 5% del ganado adulto de alta producción (Goff 2010; Youngquist y Threlfael, 2007). Esta enfermedad ocurre dentro de las 48 horas post parto, aunque un pequeño porcentaje de los casos pueden presentarse antes del parto, entre las 48 y 72 horas postparto, así como en el pico de lactación (Goff, 2010; Youngquist y Threlfael, 2007). Los signos clínicos de la enfermedad se manifiestan mediante postración, incapacidad para levantarse y presentación de fasciculaciones principalmente en los músculos de las extremidades y del cuello (Goff, 2010; Youngquist y Threlfael, 2007). Esto es debido a la pérdida progresiva de la función esquelética, cardíaca y del músculo liso generado por la disminución exacerbada de la concentración de calcio (Youngquist y Threlfael, 2007).

2.2.2. Epidemiología

La hipocalcemia, es uno de los trastornos metabólicos más importante que afecta a las vacas lecheras de transición (Mulligan *et al.*, 2006). Según Goff (2010), casi el 50% de las vacas de producción lechera experimentan una hipocalcemia subclínica a las 24 horas post parto. En otros estudios, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Horst *et al.* (2003) y Reinhardt *et al.* (2010), quienes reportaron que aproximadamente el 50% de vacas lecheras adultas experimentan hipocalcemia subclínica al momento del parto. Por otro lado, otro estudio obtuvo un rango de prevalencia entre 20 a 40% de hipocalcemia subclínica post parto (Duffield, 2006).

Al comparar la prevalencia de la hipocalcemia subclínica en diversos estudios se puede observar que los resultados son muy variables. Esto es debido a que los rangos de prevalencia dependen del punto de corte determinado para definir la enfermedad (Duffield, 2006). La literatura de fisiología humana considera como punto de corte el valor de 8.0 mg/dl para definir hipocalcemia subclínica (Guyton y Hall, 2008). Duffield (2006), determinan que el punto de corte de hipocalcemia subclínica asociado al riesgo de sacrificio en la lactancia temprana en vacas de producción lechera es de 7.21 mg/dl. Así también, Roberts *et al.*, (2012) determinaron el valor de 8.82 mg/dl, asociado al mismo riesgo. Por otro lado, Martínez *et al.*, (2012) señala como punto de corte el valor de hipocalcemia subclínica asociado al riesgo de presentación de metritis es de 8,59 mg/dl. Esto hace pensar que no hay un punto de corte fijo para discernir entre normocalcemia e hipocalcemia y que esta puede variar de acuerdo a la presentación de la enfermedad, a la alteración a la cual este ligada e incluso al lugar y sus características en donde se realice el estudio.

Por otro lado, Andresen (2001), sostiene que la hipocalcemia subclínica ocurre, durante los primeros días post parto, mientras los intestinos y huesos se adecuan a las demandas por calcio debido a la lactancia. Sin embargo, considera la existencia de factores de riesgo que reducen el eficiente funcionamiento de uno o más de los mecanismos encargados de la regulación del calcio. Los principales factores de riesgo que reducen la homeostasis del calcio son: a) el equilibrio ácido-básico de la vaca al momento del parto, b) la edad de la vaca relacionada al número de partos y c) la raza.

Uno de los principales factores de riesgo al momento del parto consiste en la presentación de alcalosis metabólica. Esta alteración en el equilibrio ácido-base puede deberse a una dieta con exceso de cationes de fácil absorción (K y/o Na). La alcalosis metabólica afecta la actividad de la PTH debido a la alteración conformacional de los sitios de unión de los rPTH. Esto disminuye la resorción ósea, así como la producción de Calcitriol (1,25(OH)₂-D₃). De este modo, se reduce la capacidad de homeostasis del calcio en el organismo para ajustarse con éxito a la demanda de Ca al inicio de la lactación (Andresen, 2001).

Según Andresen (2001), las vacas de primer parto son muy poco probables de presentar hipocalcemia clínica. Esto se puede explicar debido a que las vacas de primer parto tienen menor producción de calostro y leche, poseen más osteoclastos y más receptores intestinales de vitamina D. En la figura 8 se muestran resultados obtenidos en un estudio realizado por Reinhardt *et al.* (2010), en el cual se grafica como el aumento de la edad está relacionado a la presentación de hipocalcemia subclínica. Se puede observar que conforme aumento del número de lactaciones se genera un incremento en la prevalencia de hipocalcemia subclínica, debido a un incremento en la producción lechera en relación al número de partos.

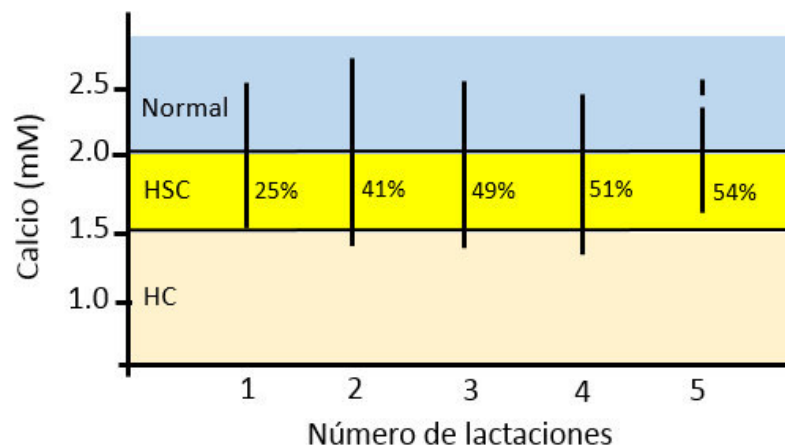


Figura 8. Relación entre el número de lactaciones y la prevalencia de la hipocalcemia subclínica en muestras recolectadas dentro de las 48 horas post parto. Fuente: Reinhardt *et al.*, 2010.

Por último, la raza es otro factor de riesgo que reduce la homeostasis del calcio. La raza más susceptible es la Jersey, esto debido a que el calostro y la leche producidos por esta raza contienen mayor cantidad de calcio. Además, esta raza posee menos cantidad de receptores intestinales de vitamina D, importante en la captación de calcio dietario (Andresen, 2001).

2.2.3. Repercusión de los bajos niveles de calcio sobre el desempeño reproductivo y la salud de las vacas lecheras

Se requiere una pronta reanudación de las funciones uterinas y ováricas para lograr que una vaca tenga un ternero cada doce a trece meses (Noakes *et al.*, 2001). Eventos como el retorno de la actividad cíclica ovárica, la involución uterina o la eliminación de la contaminación bacteriana en el útero, son necesarios para lograr una óptima fertilidad

(Sheldon y Dobson, 2004). Sin embargo, existen enfermedades metabólicas como la hipocalcemia que pueden afectar negativamente el desarrollo de estos eventos claves en el periodo post parto.

Estudios sugieren que la hipocalcemia prolonga el período del parto a la concepción, aumenta el número de inseminaciones por concepción (Gilbert *et al.*, 1993; Kim y Kang, 2003) y aumenta las tasas de sacrificio (LeBlanc *et al.*, 2002a, Gilbert *et al.*, 2005). Reinhardt *et al.* (2010), sostiene que la hipocalcemia contribuye a la presentación de infecciones uterinas. Esto se podría explicar porque los bajos niveles de calcio reducen la capacidad de las células inmunes para responder a los estímulos y disminuyen el tono del músculo liso presente en el útero (Kimura *et al.*, 2006; Chamberlin *et al.*, 2013).

Así también, se ha reportado que los bajos niveles de calcio producen una disminución de la contractilidad del rumen y del abomaso (Goff, 2010). Por lo tanto, se reduce la ingesta de materia seca y el proceso de la rumia, lo cual aumenta el riesgo de presentación de enfermedades como cetosis, desplazamiento de abomaso (Goff, 2010).

En un estudio realizado por Silva *et al.* (2011), se analizó la frecuencia de presentación de casos de desplazamiento de abomaso a la izquierda en 10 establos lecheros de Lima durante un periodo de 5 años (2000 – 2004). En este estudio se reportó la presentación de 121 casos de desplazamiento de abomaso, de los cuales el 65.3% ocurrieron entre la segunda y cuarta semana post parto. Con estos resultados Silva *et al.*, (2011) sugiere que las vacas con desplazamiento de abomaso a la izquierda pudieron haber presentado hipocalcemia subclínica.

Por otro lado, diversos estudios demuestran que al variar el Balance Catión Aniónico de la dieta (DCAD) preparto se puede favorecer una ligera acidosis metabólica capaz de atenuar la disminución de los niveles de calcio (Tucker *et al.*, 1992; Goff y Horst, 1997).

Beede (2005), recomienda un DCAD negativo, mientras Horst *et al.* (1997) determina que los valores de DCAD deberían oscilar entre -5.0 y -10.0 mEq/100 g MS. Sin embargo, Guzmán *et al.*, (2016) determinó que el valor promedio de DCAD en 9 establos que suministran sales aniónicas en la cuenca lechera de Lima fue de 6.62 ± 2.99 mEq/100 g MS. Por lo que podríamos concluir que los establos que suministran sales aniónicas no han logrado un adecuado Balance Cación Aniónico dietario, importante para atenuar la disminución de los niveles de calcio.

Como se mencionó, los bajos niveles de calcio son un factor predisponente para muchos trastornos durante el periodo de transición (Mulligan *et al.*, 2006). Las alteraciones producidas por los bajos niveles de calcio resultan en la disminución de la eficiencia reproductiva y productiva del animal, generando importantes pérdidas económicas para la industria láctea (Mulligan y Doherty, 2008).

2.3. Fisiología del Puerperio

El puerperio se define como el tiempo transcurrido entre el parto y la finalización de la involución uterina (Sheldon, 2004). Durante este periodo, ocurren simultáneamente cuatro eventos importantes: a) la involución uterina, b) la eliminación de la contaminación bacteriana, c) la regeneración del endometrio y d) el retorno de la actividad cíclica ovárica (Sheldon, 2004; Noakes, 2009).

La involución uterina es un proceso fisiológico post parto que consiste en la regresión del tamaño del útero, el cual fue modificado durante la gestación. El periodo de duración de este proceso no está especificado. Algunos autores consideran que este proceso tiene una duración de 25 a 30 días (Heppelmann *et al.*, 2013; Morrow *et al.*, 1966). Otros

autores sostienen que el periodo de involución uterina consta de 28- 35 días (Kindahl *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2006). Es importante mencionar que durante las tres primeras semanas post parto se produce una importante reducción del tamaño del útero, después de este periodo los cambios son casi imperceptibles (Noakes *et al.*, 2001).

El proceso de involución uterina inicia inmediatamente después del parto, mediante la contracción rápida del útero y del cuello uterino (Sheldon, 2004). Este proceso implica la ocurrencia de las contracciones uterinas, la retracción, la necrosis y el desprendimiento de las capas superficiales de las carúnculas, así como, la regeneración del endometrio (Sheldon, 2004).

La necrosis y el desprendimiento de las capas superficiales de las carúnculas ocurre dentro de los 12 días post parto (Noakes, 2009). Este proceso contribuye a la formación de loquios, el cual es un líquido viscoso que tiene una coloración que varía entre amarillo y marrón, sin olor desagradable (Sheldon, 2004). Los loquios derivan de los fluidos fetales, sangre de los vasos umbilicales, fragmentos de las membranas fetales, y principalmente del producto de la necrosis de las carúnculas uterinas (Sheldon, 2004; Noakes, 2009).

A su vez, la regeneración del epitelio del endometrio inicia inmediatamente después del parto (Sheldon, 2004). Se produce rápidamente en aquellas áreas que no fueron seriamente dañadas y se completa superficialmente 25 días después del parto (Sheldon, 2004; Noakes, 2009). A diferencia de las capas más profundas, las cuales se recuperan completamente entre 6 a 8 semanas (Sheldon, 2004).

Normalmente el útero en el periodo preparto se encuentra estéril (Sheldon y Dobson, 2004); sin embargo, en el post parto temprano es común que se produzca contaminación bacteriana en casi todas las vacas lecheras (Sheldon *et al.*, 2002). Al momento del parto

se alteran las barreras anatómicas conformadas por la cervix, la vagina y la vulva, lo cual predispone el ingreso de bacterias a la vagina y posteriormente al útero (Sheldon y Dobson, 2004; Földi *et al.*, 2006). Empero, esto no es sinónimo de infección, ni de desarrollo de enfermedad uterina (Azawi, 2008). El control de la contaminación bacteriana y la inhibición del desarrollo de un proceso infeccioso depende de la respuesta del organismo del animal (Lewis, 1997).

Otro evento importante del puerperio es el retorno temprano de la actividad cíclica, ya que el incremento de los niveles de estrógeno permite que el útero sea más resistente a la infección (Sheldon, 2006). Por otro lado, la eliminación de la contaminación bacteriana se produce, en parte por la acción de las células inmunes. Este proceso ocurre mediante la acción de enzimas, especies reactivas, óxido nítrico, proteasas, fosfolípidos liberados por los gránulos citoplasmáticos, y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Sheldon, 2004). La eliminación de la contaminación bacteriana también se genera por la persistencia de las contracciones uterinas, el desprendimiento del tejido caruncular y la eliminación de las secreciones uterinas que promueven la expulsión física de las bacterias (Noakes, 2004).

En conjunto, estos eventos mencionados permiten el restablecimiento del aparato reproductivo, el cual es necesario para preparar el tracto reproductivo para una posterior concepción (Bajcsy *et al.*, 2005; Noakes, 2009). Sin embargo, el periodo puerperal puede verse afectado por diversos trastornos relacionados al parto y enfermedades puerperales (Heppelmann *et al.*, 2015). Retención de membranas fetales, infecciones uterinas (Heppelmann *et al.*, 2013; Morrow *et al.*, 1966; Fonseca *et al.*, 1983; Mateus *et al.*, 2003), alteraciones metabólicas como hipocalcemia y cetosis, pueden afectar el restablecimiento

del aparato reproductivo y generar un efecto negativo en el rendimiento reproductivo del animal (Noakes, 2009).

2.3.1. Enfermedades uterinas post parto

Luego del parto, el útero de cada vaca lechera está contaminado con múltiples especies bacterianas (Sheldon *et al.*, 2002). Normalmente, las vacas son capaces de contrarrestar la contaminación bacteriana dentro de las primeras cinco semanas después del parto (Sheldon *et al.*, 2003). Si la contaminación bacteriana persiste y los mecanismos o barreras que intervienen en la defensa del organismo fallan, se produce la infección o enfermedad uterina (LeBlanc *et al.*, 2002b; Lambertz *et al.*, 2014, Azawi, 2008).

Las enfermedades uterinas son trastornos que afectan a las vacas lecheras durante el periodo post parto (Wagner *et al.*, 2002; Risco y Hernández, 2003); a su vez, generan infertilidad durante el proceso infeccioso y puede ser causa de subfertilidad (Azawi, 2008).

Las enfermedades uterinas más comunes en vacas lecheras son: metritis puerperal, endometritis y piometra (Sheldon *et al.*, 2006). En promedio, el 20-40% de los bovinos desarrollan una enfermedad uterina clínica aguda dentro de la semana post parto (metritis), el 20% tiene una enfermedad clínica persistente 3 semanas después del parto (endometritis clínica), aproximadamente el 30% tiene una inflamación crónica subclínica del útero (endometritis subclínica) (Opsomer *et al.*, 2000; Drillich *et al.*, 2001; Sheldon *et al.*, 2006; Lincke *et al.*, 2007), y la piometra representa del 2% al 5% de los casos clínicos de las enfermedades uterinas en las vacas (Mickelsen *et al.*, 1986; Sheldon *et al.*, 2008).

La metritis puerperal es una enfermedad sistémica, la cual se presenta dentro de los 21 días post parto (Drillich *et al.*, 2001). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de descarga uterina acuosa fétida de color rojo-marrón, pirexia (Drillich *et al.*, 2001), disminución de la producción lechera, anorexia, incremento de la frecuencia cardiaca y deshidratación (Sheldon *et al.*, 2006). La endometritis clínica se caracteriza por agrandamiento anormal del diámetro de cuello uterino con presencia de descarga purulenta o mucopurulenta, presente después de los 21 o 26 días post parto respectivamente, lo cual ocurre en ausencia de signos clínicos sistémicos (LeBlanc *et al.*, 2002b; Sheldon *et al.*, 2006). Mientras que la endometritis subclínica, es la inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos y que ocurre a partir de los 21 días post parto (Sheldon *et al.*, 2006). Además, presenta un porcentaje de PMN > 18% en muestras de citología uterina colectadas entre los 21 y 33 días post parto, o un porcentaje mayor al 10% de PMN en muestras colectadas entre los 34 y 47 días. (Sheldon *et al.*, 2006).

Por último, la piometra es definida como el acúmulo de exudado purulento en el lumen uterino con la presencia de cuerpo lúteo persistente y un canal cervical cerrado (Noakes *et al.*, 1990; Sheldon *et al.*, 2006; Bondurant, 1999), sin la presencia de signos clínicos sistémicos (Palmer, 2014).

2.4. Endometritis

2.4.1. Definición

La endometritis es la inflamación superficial del endometrio, la cual no se extiende más allá del estrato esponjoso y de los tejidos glandulares subyacentes (LeBlanc *et al.*,

2002b, Sheldon *et al.*, 2006). Histológicamente, se puede apreciar cambios degenerativos en el epitelio superficial, congestión vascular y migración de neutrófilos y otras células inflamatorias (Sheldon *et al.*, 2006; Földi *et al.*, 2006).

La endometritis puede presentar las siguientes características: agrandamiento anormal del diámetro del cuello uterino (LeBlanc *et al.*, 2002b; Sheldon *et al.*, 2006), incremento de PMN en muestras de citología uterina (Sheldon *et al.*, 2006) y presencia de descarga vaginal con flujo mucopurulento o purulento (Sheldon y Noakes, 1998).

Algunos autores la clasifican en endometritis clínica y subclínica. La endometritis clínica se caracteriza por un agrandamiento anormal del diámetro de cuello uterino ($> 7,5$ cm) con presencia de descarga purulenta o mucopurulenta después de los 21 o 26 días post parto, lo cual ocurre en ausencia de signos clínicos sistémicos (LeBlanc *et al.*, 2002b; Sheldon *et al.*, 2006). A su vez, la endometritis subclínica se define como la inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos y que ocurre a partir de los 21 días post parto (Sheldon *et al.*, 2006). Esta alteración presenta un porcentaje de PMN $> 18\%$ en muestras de citología uterina colectadas entre los 21 y 33 días post parto, o un porcentaje mayor al 10% de PMN en muestras colectadas entre los 34 y 47 días. (Sheldon *et al.*, 2006).

La endometritis es la forma menos severa de enfermedad uterina, debido a que la inflamación se limita a la superficie del endometrio (LeBlanc *et al.*, 2002b, Sheldon *et al.*, 2006). Sin embargo, esta alteración causa infertilidad al momento de la infección y produce subfertilidad aún después de la resolución de la enfermedad (Herath *et al.*, 2006).

2.4.2. Epidemiología

En promedio, estudios reportan que un 20% y un 30 % de las vacas lecheras desarrollan endometritis clínica y subclínica respectivamente, en un periodo de 21 días post parto (Markusfeld 1987; Borsberry y Dobson 1989; Opsomer *et al.*, 2000; Drillich *et al.*, 2001; Sheldon *et al.*, 2006; Lincke *et al.*, 2007). En otros estudios, el 15% de las vacas lecheras desarrollan endometritis clínica (LeBlanc *et al.* 2002b; Sheldon *et al.*, 2006) y un 15% de desarrollan endometritis subclínica después de los 21 días post parto (LeBlanc *et al.*, 2011).

Los factores de riesgo relacionados con la endometritis son: el grado de contaminación del medio ambiente, el parto gemelar, la retención de placenta y la presentación de partos distócicos (Sheldon y Dobson, 2004; Bell y Roberts, 2007). Así también, alteraciones como el desplazamiento del abomaso a la izquierda, hipocalcemia y cetosis han sido asociadas a la presentación de infecciones uterinas (Sheldon y Dobson, 2004; Bell y Roberts, 2007). En general, cualquier condición que altere la inmunidad post parto, se convierte en un factor predisponente para la presentación de enfermedades uterinas y el deficiente desempeño reproductivo (Sheldon y Dobson, 2004).

2.4.3. Diagnóstico

El diagnóstico de endometritis se ha visto obstaculizado por la falta de una definición universalmente aceptada (Gilbert *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006). Así como, por la búsqueda de técnicas de diagnóstico simples y eficaces (Barlund *et al.*, 2008). Es necesario mencionar que todas las vacas post parto experimentan algún grado de

inflamación endometrial, el cual está asociado al proceso de involución uterina normal. No obstante, los veterinarios deben ser capaces de identificar con precisión las vacas realmente enfermas (Sheldon *et al.*, 2006).

Durante años se han utilizado varias técnicas de diagnóstico para identificar la presentación de endometritis en vacas lecheras. Técnicas como la ecografía, la vaginoscopía, la citología uterina, la prueba de MCDougall (Westerman *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2012a, Machado *et al.*, 2012b) y la palpación rectal, son los métodos de diagnóstico más usados.

Por otro lado, algunas herramientas de diagnóstico pueden ofrecer ventajas con respecto a otras (Bicalho *et al.*, 2015) así como, presentar variación con respecto al criterio de evaluación o con respecto a la sensibilidad y especificidad (De Boer *et al.*, 2014). Empero, no ha surgido consenso sobre cuál es la herramienta que logre predecir mejor el impacto negativo en los resultados reproductivos (Bicalho *et al.*, 2015), ni existe una prueba de oro para el diagnóstico de endometritis (LeBlanc *et al.*, 2002a, Williams *et al.*, 2005).

2.4.3.1. Palpación transrectal

El útero de la vaca se ubica ventral al recto y reposa en el piso de la cavidad pélvica (Hafez, 2000). Esta ubicación posibilita su manipulación mediante la palpación transrectal (Senger, 2003). La técnica de la palpación rectal se basa en la estimación del tamaño, simetría y consistencia de las estructuras (Azawi, 2008). Esta técnica tiene como objetivo la detección de hallazgos patológicos, tales como: incremento del diámetro de los cuernos uterinos del útero, contenido fluctuante, pared uterina endurecida; los cuales se relacionan con signos presentes en la endometritis (Callahan y Horstman, 1993).

Según LeBlanc *et al.* (2002^a), un diámetro cervical mayor a 7,5 cm a partir de los 21 días en lactación es indicativo de endometritis y tiene valor predictivo para la fertilidad. Sin embargo, el agrandamiento del útero no es exclusivo de endometritis, puesto que existen variaciones del tamaño del útero asociadas con la raza, la edad y la nutrición (Dohmen *et al.*, 2000; LeBlanc *et al.*, 2002a; Sheldon *et al.*, 2006).

En un estudio se realizó la comparación de la estimación del diámetro cervical mediante palpación transrectal y ultrasonografía. El diámetro cervical estimado mediante palpación transrectal fue inferior en 0.6 cm con respecto a las medidas estimadas mediante ultrasonografía. Sin embargo, a mayor diámetro cervical la diferencia de cálculo fue mayor y la correlación entre ambas técnicas fue baja. Encontrándose que las vacas con un diámetro cervical mayor a $6,0 \pm 0,2$ cm fueron diagnosticadas erróneamente con un diámetro cervical mayor a 7,5 cm (Leutert *et al.*, 2013).

La palpación transrectal es una técnica de uso común en el diagnóstico de endometritis en la práctica clínica (Heuwieser *et al.*, 2000). Además, es el método más antiguo, más empleado y de menor costo en la exploración del útero en vacas lecheras (Noakes *et al.*, 2001). Sin embargo, es un método subjetivo y presenta poca asociación con el rendimiento reproductivo (Sheldon *et al.*, 2006). Además de ser considerado un método de diagnóstico de baja sensibilidad y especificidad (Divers y Peek, 2008).

2.4.3.2. Vaginoscopía

La vaginoscopía consiste en la inspección de las estructuras vaginales y cervicales mediante el uso de un dispositivo denominado vaginoscopio. El vaginoscopio es un instrumento cilíndrico, hueco, con o sin iluminación y que generalmente está hecho de acero inoxidable (Rinaudo, 2012). La evaluación mediante este dispositivo consiste en

observación de la mucosa de la vagina y la cérvix, evaluándose su coloración y la presencia de exudado mucoso o purulento (Rinaudo, 2012). Según LeBlanc *et al.*, (2002^a) la presencia de moco en la vagina a partir de los 21 días post parto o la presencia de descarga mucopurulenta a partir de los 26 días post parto están asociados a la presentación de endometritis clínica.

El diagnóstico de endometritis puede verse alterado por la presentación de vaginitis debida a cambios conformacionales del periné y la variación del volumen de flujo encontrado durante la etapa del estro (Hafez, 2000; Kasimanickam *et al.*, 2004). En esta etapa se produce un aumento en la secreción de estradiol, lo que genera un aumento de la producción de moco cervical y de las contracciones del miometrio (Hafez, 2000; Kasimanickam *et al.*, 2004).

A pesar de ello, el uso del vaginoscopio en la detección de una descarga vaginal es una técnica más precisa para el diagnóstico de endometritis que la palpación rectal (Miller *et al.*, 1980; Dohmen *et al.*, 1995; Barlund *et al.*, 2008). Es un método de diagnóstico que favorece la determinación del origen del flujo, el cual puede provenir del útero, cérvix o vagina (Williams *et al.*, 2005). En estudio realizado por Barlund *et al.* (2008), se reporta una sensibilidad y especificidad de 53.9% y 95.4%, respectivamente, tomando como referencia diagnóstica a la citología endometrial.

Aunque la vaginoscopía es una técnica bastante precisa más precisa cuando se compara con la palpación rectal (Miller *et al.*, 1980; Dohmen *et al.*, 1995; Barlund *et al.*, 2008), este dispositivo se utiliza con poca frecuencia como una herramienta de diagnóstico de la endometritis en vacas lecheras (Youngquist y Shore, 1997). Esto es debido a su manejo no es muy sencillo y genera mucho estrés al paciente (Kasimanickam

et al., 2005). Así también, puede transmitir enfermedades, es un equipo costoso (LeBlanc *et al.*, 2002a) y posee una baja sensibilidad (Barlund *et al.*, 2008).

2.4.3.3. Ultrasonografía

El ultrasonógrafo permite una medición objetiva del diámetro de los cuernos uterinos y del cuello uterino, además de la visualización de mucus o pus en el lumen uterino (Sheldon *et al.* 2003; Kasimanickam *et al.*, 2004; Kamimura *et al.*, 1993). La evaluación de la endometritis mediante ultrasonografía se basa en la visualización de fluido ecogénico mixto dentro de la luz uterina después 21 días después del parto (Sheldon *et al.*, 2006).

Estudios demostraron el empleo del vaginoscopio y la palpación transrectal como técnicas de diagnóstico que consumen menos tiempo y son más económicas que la ultrasonografía transrectal, sin embargo la ultrasonografía posee mayor sensibilidad y especificidad (Lambertz *et al.*, 2014). A pesar de ello, el uso de la ultrasonografía transrectal es muy limitado en los hatos lecheros. Esto se debe principalmente a razones económicas y logísticas para su aplicación (McDougall *et al.* 2007), a pesar de ser una técnica de diagnóstico inmediato (Barlund *et al.*, 2008).

2.4.3.4. Citología uterina mediante citocepillo

La técnica de citología uterina mediante el uso citocepillo se basa en el conteo de polimorfonucleares observados en las muestras tomadas del raspado de la pared uterina usando un citocepillo (De Boer *et al.*, 2014). La muestra es extendida en un portaobjetos, se somete a fijación, se tiñe y finalmente es evaluada a través de un microscopio por

(Kasimanickam *et al.*, 2005). Para obtener una confiable y adecuada lectura es necesario contar con un elevado número de células bien conservadas (Roszel *et al.* 1988).

Las muestras colectadas entre los 21 y 33 días post parto que presentan un porcentaje de polimorfonucleares mayor a 18% o las muestras colectadas entre los 34 y 47 días que presentan un porcentaje de polimorfonucleares mayor que 10%, son diagnosticadas como positivas a endometritis subclínica. (Sheldon *et al.* 2006).

Algunos autores consideran que es una técnica factible y segura (Barlund *et al.*, 2008; kasimanickam *et al.*, 2005). Así también, esta técnica diagnóstica es considerada como la prueba estándar para el diagnóstico definitivo de endometritis (Griffin *et al.*, 1974, Bonnett *et al.*, 1991, Kasimanickam *et al.*, 2004, Kasimanickam *et al.*, 2005, Drillich *et al.*, 2004). Sin embargo, según otros autores, las muestras tomadas mediante citología no son representativas de todo el ambiente uterino y el muestreo de diferentes áreas de la mucosa uterina podrían dar resultados diferentes (Bicalho *et al.*, 2015). Otro inconveniente de esta prueba es que no proporciona resultados inmediatos en condiciones de campo porque es necesario llevar la muestra a un laboratorio para su procesamiento (Williams *et al.*, 2005, Bicalho *et al.*, 2015), además los materiales requeridos no siempre se encuentran disponibles (Barlund *et al.*, 2008).

2.4.3.5. Prueba de McDougall

La prueba de McDougall es un método usado en el diagnóstico de endometritis, que se basa en la evaluación macroscópica de la descarga vaginal en la etapa post parto (McDougall *et al.*, 2007). La muestra se obtiene mediante el empleo de un dispositivo comercial denominado Metrichick®, el cual colecta el contenido del fondo de la vagina (McDougall *et al.*, 2007).

El dispositivo Metrichcek[®] (figura 9) es una barra de acero inoxidable de 50 cm de longitud y 8 mm de diámetro. Presenta un mango en el extremo a manipular y un hemisferio de goma de 2,5 cm de diámetro en el extremo contrario (Runcinam *et al.* 2009).



Figura 9. MetrichcekTM (Simcrotech, Hamilton, New Zealand; www.simcrotech.co.nz).






Esta prueba se realiza introduciendo el hemisferio de goma por la vulva hasta llegar a la vagina anterior. Una vez colectada la muestra se somete a la evaluación macroscópica (Runcinam *et al.*, 2009). El flujo visualizado dentro de la superficie cóncava o adherido a la superficie convexa del dispositivo se analiza y clasifica dentro de la escala descrita por McDougall *et al.* (2007). Las hembras que presenten una puntuación mayor a 1 serán consideradas como positivas al diagnóstico de endometritis. (McDougall *et al.*, 2007). La puntuación de la técnica de McDougall se describe en el cuadro 1.

Se ha reportado que el examen del contenido vaginal para la detección de pus y contenido cervical es la herramienta más útil para el diagnóstico de endometritis (LeBlanc *et al.*, 2002a; Sheldon y Dobson, 2004). Estudios realizados muestran una correlación de la presencia de descarga vaginal purulenta con la existencia de bacterias patógenas en el útero (LeBlanc *et al.*, 2002b, Williams *et al.*, 2005).

Entonces, aunque la prueba de McDougall no es evidencia histológica de inflamación endometrial, requerida para el diagnóstico definitivo de endometritis (McDougall *et al.*, 2007). Diversos estudios en hatos lecheros han demostrado que la prueba de McDougall tiene una buena capacidad diagnóstica de 96.2% sensibilidad y 77.6% de especificidad al ser comparado con el vaginoscopio, el cual tienen una sensibilidad y especificidad de 71.5% y 87% respectivamente (McDougall *et al.*, 2007; Runciman *et al.*, 2009; Dubuc *et al.*, 2010a). Y es considerada una técnica alternativa económica, no invasiva, efectiva, fácil, y rápida de operar en campo (McDougall *et al.*, 2007; Bicalho *et al.*, 2015). A diferencia de otros exámenes como vaginoscopía, ultrasonografía o citología; cuyos requerimientos de tiempo y equipos pueden limitar su uso en los hatos lecheros por razones logísticas y económicas (McDougall *et al.* 2007).

A pesar del contraste de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico, no se ha determinado el beneficio económico obtenido por una mayor sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas para el diagnóstico de las enfermedades uterinas (De Boer *et al.*, 2014). No obstante, es probable que una cierta reducción de la sensibilidad y especificidad en el entorno clínico sea aceptable con el fin de reducir los costos y el tiempo de obtención de resultados (De Boer *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Score descrito por McDougall realizado para el diagnóstico de endometritis.

Prueba de McDougall		
Score	Descripción	Macroscopía
0	Ninguna descarga observable	
1	Moco claro y limpio	
2	Moco con manchas de material purulento	
3	Secreción mucopurulenta con menos de 50% de material purulento	
4	Secreción mucopurulenta con más del 50% de material purulento	
5	Secreción mucopurulenta con más del 50% de material purulento y con olor fétido	

2.5. Importancia de la endometritis en el desempeño productivo y reproductivo

La endometritis es una de las enfermedades reproductivas más importantes de la industria lechera. Estudios revelaron que un promedio del 28% de las vacas paridas presentaron endometritis, con una incidencia que oscila entre 5,3 a 52,6% (Dubuc *et al.*, 2010a; Cheong *et al.*, 2012).

En un metanálisis realizado con 23 estudios relacionados a la presentación de la endometritis, se encontró que la presentación de esta enfermedad aumenta en 15 días el promedio de los días abiertos, disminuye en 31% la tasa de preñez a los 150 días en leche y reduce la tasa de concepción en un 16% (Fourichon *et al.*, 2000). A su vez, Herath *et al.* (2006) han reportado que vacas tratadas exitosamente contra endometritis presentaron una tasa de concepción de 20% más baja comparado con animales sanos y un 3% de vacas que permanecen infértiles.

En conclusión, la endometritis afecta la eficiencia productiva y reproductiva del animal (LeBlanc *et al.*, 2002a; Gilbert *et al.*, 2005; Sheldon *et al.* 2006); estos son de gran importancia para la industria lechera moderna puesto que repercute en el resultado económico de la empresa y la industria lechera.

2.6. La endometritis en el ganado lechero de Lima

La etapa comprendida entre el primer parto y la eliminación del animal del hato lechero corresponde al periodo de vida productiva (Battistini, 1958). Este periodo refleja la habilidad del animal para no ser descartado por causas como la baja producción, presentación de enfermedades o la baja fertilidad (Vollema, 1996). Sin embargo, las

causas de descarte deberían ser por razones voluntarias del productor, mas no por razones involuntarios como problemas locomotores, de salud o reproductivos, entre otros (Ferguson, 1995).

Estudios realizados en 7 establos de la cuenca de Lima muestra que solo el 57% de las vacas llegan a tener 4 partos (Salazar, 1993). Esto podría estar relacionado con un estudio realizado por Orrego *et al.* (2003), en el que menciona que a través de los años se ha observado un incremento en los trastornos de fertilidad en los animales destinados para descarte. A su vez, determinó que los problemas reproductivos representan el 52,7% del total de descartes en los establos lecheros de Lima.

Por otro lado, evaluaciones de los parámetros reproductivos en la cuenca lechera de Lima, encuentran un promedio de 15.2 meses como intervalo parto-concepción (Ortiz, 2006), el cual es diferente a los 13 meses sugeridos por Bartolomé y Archbald (2011). Así también, la tasa de servicio de los establos lecheros de crianza intensiva de Lima es de 44.6% (Sandoval, 2016), la cual encuentra se encuentra por debajo del valor recomendado de 70% por Bartolomé y Archbald (2011).

Si bien, existen estudios de los parámetros reproductivos de las vacas lecheras en la cuenca lechera de Lima. No se han realizado estudios acerca de los trastornos de fertilidad, ni de sus causas, las cuales podrían estar relacionadas a los bajos índices de los parámetros reproductivos reportados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración

El presente estudio observacional se realizó en tres establos lecheros de crianza intensiva de la provincia de Lima. El periodo del estudio fue de un año, el cual se realizó durante el año 2016.

3.2. Recopilación de datos

Se realizó la recopilación de datos de los registros de los establos muestreados.

Los datos recopilados fueron los siguientes:

A. Datos de los registros productivos:

- Producción de leche por vaca/día
- Fecha de control de ordeño

B. Datos de los registros reproductivos:

- Fecha de parto
- Número de partos

C. Otros datos

- Fecha del diagnóstico de endometritis
- Enfermedades padecidas por el animal
- Tipo de parto
- Mortalidad del ternero al parto
- Sexo de la cría

3.3. Metodología empleada en el estudio

3.3.1. Criterios de inclusión de los establos

Los establos seleccionados en el estudio cumplieron los siguientes criterios de inclusión: se encontraran dentro de la provincia de Lima, fueron establos de producción intensiva, su alimentación fue en base a forraje y concentrado, realizaban ordeño mecánico, realizaban inseminación artificial, tuvieron más de 200 vacas en producción y tuvieron, en su mayoría, vacas de raza tipo Holstein.

3.3.2. Creación de un banco de suero

Los establos seleccionados no realizaban la medición de los niveles de calcio sérico. Con la finalidad de obtener información acerca de los niveles de calcio sérico fue necesario realizar la colección de muestras de todos los animales durante la primera semana post parto. La creación del banco de suero permitió obtener información de las vacas que fueron seleccionadas en el estudio, el cual fue realizado posterior al diagnóstico de endometritis.

3.3.2.1. Obtención de muestras de sangre

La colección de muestras de sangre se realizó durante la primera semana post parto y se muestreó desde el día 1 hasta el día 7 post parto (Chapinal *et al.*, 2012). Se ha demostrado que durante la primera semana post parto se presentan los niveles de calcio sérico más bajos (Mateus y Lopes da Costa, 2002). Una vez realizada la sujeción del animal, se procedió a limpiar y desinfectar el área de extracción de la muestra. Luego se colectó aproximadamente 6 ml de sangre de la vena coccígea, mediante el uso de una aguja Vacutainer ® (20 mm x 1') y un tubo colector, el cual contenía activador de coagulación (BD Vacutainer ®). Una vez obtenida la muestra, se rotuló el tubo con la identificación de la vaca, fecha de muestreo, establo y alguna observación encontrada. Finalmente, los tubos de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos (Ribeiro *et al.*, 2013).

3.3.2.2. Obtención de la muestra de suero

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos para lograr la separación del suero (Ribeiro *et al.*, 2013). Se almacenó el suero en crioviales adecuadamente rotulados, posteriormente las muestras se transportaron al laboratorio dentro de las 5 horas en un recipiente con gel refrigerante. Finalmente fueron conservadas a una temperatura de congelación de -20°C (Ribeiro *et al.*, 2013).

3.3.3. Diagnóstico de endometritis

El diagnóstico de endometritis se realizó mediante el dispositivo Metricheck® y la evaluación de la muestra se basó en el score descrito por McDougall *et al.* (2007). El diagnóstico de endometritis se realizó a los 35 ± 3 días post parto. Para la realización del diagnóstico de endometritis se preparó una solución de lavado empleando agua y yodo povidona al 10% (Dilución hasta 1:10; Durani y Leaper, 2008) en un recipiente largo y estable. Luego se sumergió el dispositivo Metricheck en dicho recipiente por mínimo 5 minutos (Durani y Leaper, 2008), con la finalidad de desinfectar el dispositivo. Se sujetó adecuadamente al animal para poder realizar el diagnóstico de manera segura. Después, se procedió a realizar el aseo de la vulva, para ello se lavó con agua y se secó con papel toalla. Posteriormente se colocó una cantidad pequeña (0.5 ml Aprox.) de gel lubricante en la superficie convexa del Metricheck. Se entreabrieron los labios vulvares con los dedos, para luego introducir el dispositivo Metricheck® hasta que el extremo distal entrara en contacto con la pared del fondo de la vagina. Se retiró el dispositivo mediante un movimiento de tracción suave y firme. El contenido visualizado dentro de la superficie cóncava del dispositivo se analizó y clasificó de acuerdo a la escala descrita por McDougall *et al.*, (2007) (Cuadro 1). Las vacas que presentaron puntuación mayor a 1 fueron consideradas como vacas con endometritis (McDougall *et al.*, 2007). Una vez finalizado el examen se lavó minuciosamente el dispositivo Metricheck y se dejó reposar por 5 minutos en la solución desinfectante (Durani y Leaper, 2008).

3.3.4. Medición de los niveles de calcio sérico

Los niveles de calcio séricos fueron evaluados mediante espectrofotometría empleando un kit de diagnóstico comercial denominado Ca Color AA – Wiener. Las muestras fueron puestas a temperatura ambiente para generar su descongelamiento y homogenizadas para su procesamiento. Las muestras de suero fueron evaluadas mensualmente, con finalidad de acumular un número de muestras considerable. Para cada procesamiento se preparó una muestra blanco, una muestra estándar y el conjunto de muestras a evaluar. La preparación de la muestra Blanco consistió en la mezcla de 1 ml de la solución O-cresoltaleín complexona y 8-hidroxiquinolina (Reactivo A), 1 ml de la solución aminometil propanol (Reactivo B) y 50 ul de agua destilada. La preparación de la muestra estándar fue similar, pero contuvo 50 ul del Estándar, en vez de agua destilada. Así mismo, las muestras a evaluar contuvieron la misma mezcla pero se agregaron 50 ul del suero, en vez de agua destilada. Estas reacciones se mezclaron e incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente (15 – 25°C). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se trasladó el contenido de cada tubo a una cubeta para espectrofotometría (Cubeta-UV semimicro 1.5 - 3 ml BRAND®, gama de aplicación de 230 a 900 nm). Para la lectura de la absorbancia fue necesario programar el espectrofotómetro (20 Genesys, ThermoSpectronic) a 570 nm y posteriormente calibrarlo empleando la muestra Blanco y la muestra estándar. La lectura de la absorbancia se realizó dentro de los primeros 20 minutos después de haber terminado el periodo de incubación, tiempo en el cual la reacción generada permanece estable.

El nivel de calcio de cada muestra fue obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de calcio (mg/dl)} = \text{Abs M} * (10 \text{ mg/dl}) / \text{Abs S}$$

Donde:

Abs S absorbancia del Estándar

Abs M absorbancia de la muestra

3.4. Diseño de estudio

Se realizó un estudio caso control, en el cual se seleccionó un grupo de animales controles es decir que no presentaban endometritis y un grupo de animales casos, los cuales presentaban endometritis. El diagnóstico de endometritis se realizó entre el día 35 ± 3 días post parto. Los criterios de exclusión de dichos animales fueron: vacas que murieron antes del diagnóstico de endometritis, vacas que presentaron menos de 20 litros de producción de leche a pico de producción, vacas de raza diferente a Holstein, vacas que presentaron partos distócicos, partos dobles, vacas que parieron terneros muertos, abortos; así también, vacas que presentaron retención de placenta, metritis puerperal, hipocalcemia clínica u otras enfermedades y vacas que fueron tratadas con calcio intravenoso.

Posterior a la selección de los animales se evaluaron si los casos o controles procedían de vacas con altos o bajos niveles de calcio, consireándose también la paridad (primíparas y multíparas) , estación del año (verano: febrero, marzo, abril, mayo; invierno: Junio, julio, agosto, setiembre) , sexo de la cría (hembra y macho) y establos (establo 1, establo 2 y establo 3).

3.4.1. Cálculo del tamaño muestral

El presente trabajo con un total de 213 vacas, de las cuales 127 vacas presentaron endometritis y 86 vacas no presentaron la enfermedad. El cálculo del tamaño mínimo muestral se realizó en base a los resultados obtenidos en un estudio piloto, en el cual se trabajó con 40 vacas (31 multíparas y 9 primíparas), que parieron en invierno. El 60% del total de vacas presentaron niveles de calcio sérico menor a 8mg/dl, de las cuales el 75% presentaron endometritis; mientras que el 40% restante del total de vacas presentaron niveles de calcio sérico mayores a 8 mg/dl, de las cuales el 44% presentaron endometritis.

El cálculo del tamaño mínimo muestral se determinó mediante la fórmula propuesta por Pértegas y Pita (2002) para estudio de casos y controles.

$$nA = \kappa nB \text{ y } nB = (1/\kappa pA(1-pA) + 1/pB(1-pB)) ((z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})/\ln(OR))^2$$

Donde:

- κ nA/nB es la relación entre las vacas con menos de 8 mg/dl y las vacas con más de 8 mg/dl (60%/40%=1.5)
- pA es la proporción de animales con endometritis en las vacas con menos de 8 mg/dl (75%)
- pB es la proporción de animales con endometritis en las vacas con más de 8 mg/dl (44%)
- α es error tipo I (5%)
- β es error tipo II (20%), por lo tanto $1-\beta$ es poder de la prueba (80%)
- OR es el odds ratio (3.82)

Según la fórmula, para este estudio se necesitaron 34 controles y 51 casos como tamaño mínimo de muestra.

3.4.2. Modelo de estudio

El modelo de regresión logística binaria planteado para este trabajo se muestra a continuación:

$$\ln \left(\frac{p_{ijklmn}}{1-p_{ijklmn}} \right) = \beta_1 + \beta_2 NC_i + \beta_3 P_j + \beta_4 EA_k + \beta_5 SC_l + \beta_6 E_m + \epsilon_{ijklmn}$$

Donde:

p_{ijklmn} es la probabilidad de que se presente la endometritis en la $ijklmn$ -ésima

(1: Sin endometritis [Score 0, 1]; 2: Con endometritis [Score 2,3,4,5]).

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$ son los coeficientes de regresión.

NC_i es el nivel de calcio en la i -ésima (1: > 7.44 mg/dl; 2: < 7.44 mg/dl)

P_j es la paridad en la j -ésima (1: Primíparas; 2: Multíparas)

EA_k es la estación del año en la k -ésima (1: Verano; 2: Invierno)

SC_l es el sexo de la cría en la l -ésima (1: Hembra; 2: Macho)

E_m es el establo en la m -ésima (1: Establo 1; 2 Establo 2; 3: Establo 3)

ϵ_{ijklmn} es el error aleatorio de la $ijklmn$ -ésima.

El modelo incluyó como variables independientes al establo (establo 1, 2 y 3), el sexo de la cría (hembra y macho), la paridad (multíparas y primíparas), la estación del año (verano e invierno) y el nivel de calcio (como alto o bajo según el punto de corte obtenido), y como variable dependiente la presencia (score 2, 3, 4 y 5) o ausencia de endometritis (score 0 y 1). Se retiraron del estudio las variables independientes que no resultaron significativas (> 0.1) mediante el empleo del método de selección de variables para regresión logística. Las variables que resultaron significativas se evaluaron mediante

un análisis de Regresión logística para obtener los OR ajustados de cada variable independiente con respecto a la presentación de endometritis.

3.4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el empleo del software IBM SPSS Statistics 22. El punto de corte determinado mediante el análisis ROC (Característica Operativa del Receptor) fue el punto que presentó mayor sensibilidad y especificidad combinados, el cual fue identificado por el índice de Youden. La sensibilidad fue la proporción de vacas con endometritis que se encontró por encima del umbral, y la especificidad fue la proporción de animales sin endometritis que se encontró por debajo del umbral (Guilidori *et al.*, 2013). Para determinar la relación entre los niveles de calcio sérico y la presentación de endometritis, se empleó una regresión logística. Se empleó el método de selección de variables de eliminación hacia atrás para descartar las variables independientes que no resultaran significativas (> 0.1). Los resultados del análisis estadístico realizado se consideraron significativos cuando presentaron un nivel de significancia menor a 5%. Los betas estimados, el error estándar del beta estimado y los odds ratios (OR) ajustados fueron reportados. En este estudio, el odds ratio fue usado como una medida epidemiológica de asociación entre las variables independientes y la variable dependiente (presencia de endometritis). En cada variable, la categoría de referencia tuvo un odds ratio igual a uno ($OR=1$). Un odds ratio ajustado mayor a uno ($OR>1$) indica que la probabilidad de presentar endometritis se ha incrementado en comparación con las vacas de la categoría de referencia.

IV. RESULTADOS

En una primera etapa del estudio se determinó mediante análisis ROC (Característica Operativa del Receptor) el valor de 7.44 mg/dl como punto de corte para el nivel de calcio predictivo en la presentación de endometritis (Figura 10). Se seleccionó este punto de corte por haber obtenido el mayor índice de Youden, el cual obtuvo un valor máximo de 0,126 (Figura 11). Por lo tanto, las vacas con un nivel de calcio sérico por debajo de 7.44 mg/dl tienen mayor riesgo de presentar endometritis que las vacas con un nivel de calcio sérico por encima de este valor.

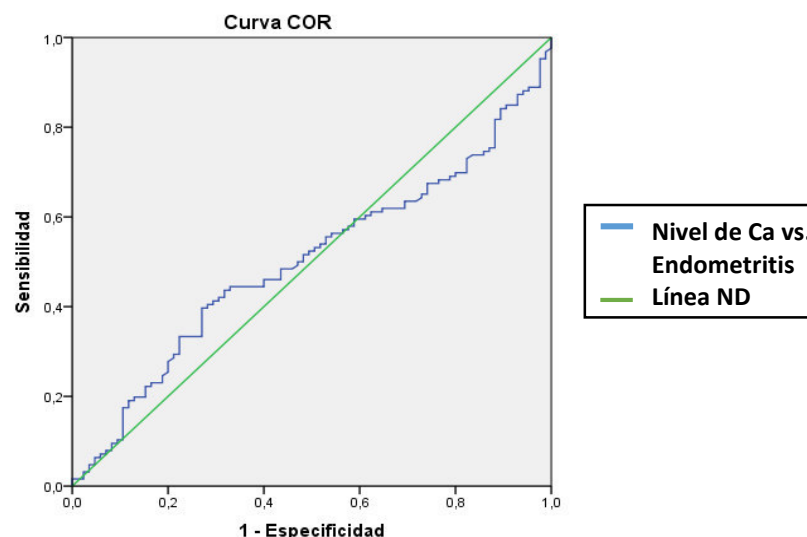


Figura 10. Gráfico del análisis ROC de la relación entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en las vacas lecheras (Nivel de Ca vs. Endometritis) y línea de no-discriminación (línea ND). La flecha indica el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad conjuntas más alta.

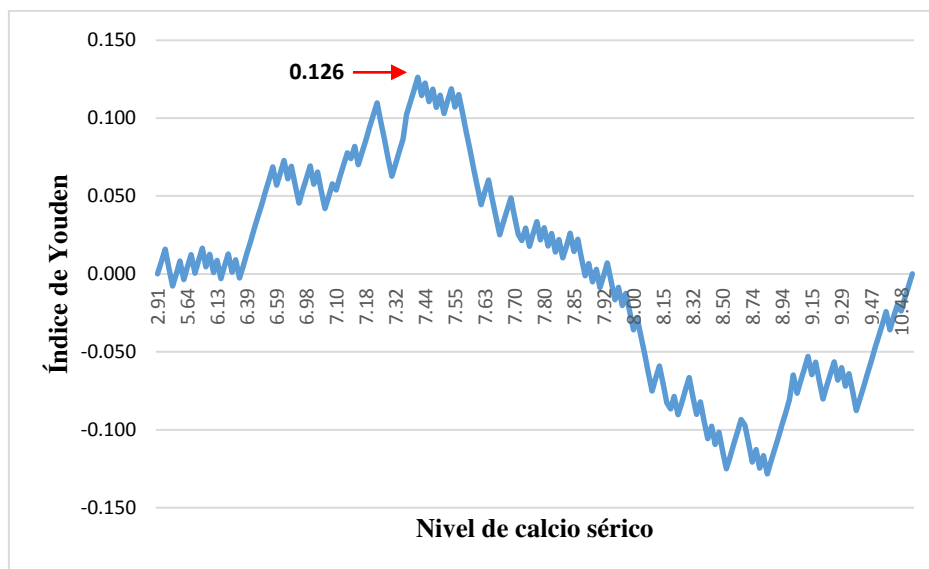


Figura 11. Índice de Youden (Flecha) resultante de la relación entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en las vacas lecheras (línea azul).

A continuación, en el cuadro 2 se presenta una tabla de contingencia en la cual se puede apreciar la distribución de los casos de endometritis según el nivel de calcio sérico en la primera semana post parto. Se puede observar que las vacas que presentaron niveles de calcio sérico menores que 7.44 mg/dl tuvieron una mayor presentación de endometritis (68.5%) en comparación a las vacas que presentaron niveles de calcio sérico mayores que 7.44 mg/dl (55.0%). Según estos resultados, la razón de probabilidades (OR) es de 1.78, IC al 95% = 0.98 a 3.23. Siendo 1.78 veces más posible que una vaca presente endometritis cuando presenta niveles de calcio sérico por debajo de 7.44 mg/dl en comparación a una vaca que presente niveles de calcio por encima de este valor.

Cuadro 2. Tabla de contingencia entre el nivel de calcio sérico y la presentación de endometritis en vacas lecheras de Lima.

			ENDOMETRITIS		
			Negativo	Positivo	Total
NIVEL DE CALCIO (NCa)	Mayor que 7.44 mg/dl	Recuento	63	77	140
		% del NCa	45.0%	55%	100%
	Menor que 7.44 mg/dl	Recuento	23	50	73
		% del NCa	31.5%	68.5%	100%
	Total	Recuento	86	127	213
		% del NCa	40.3%	59.7%	100%

Posteriormente se realizó el análisis de regresión logística, para lo cual se realizó el descarte de variables no significativas, mediante el método de selección de variables de eliminación hacia atrás. Las variables con un nivel de significancia por encima del 10% fueron separadas del estudio. En un primer paso se separó del modelo la variable “sexo de la cría”, por presentar un nivel de significancia de 48%. En un segundo paso, se separó del modelo la variable “establo”, por presentar un nivel de significancia de 38%. Finalmente, las variables que permanecieron en el modelo fueron: estación del año, paridad y nivel de calcio por presentar niveles de significancia de 2.2%, 0% y 1.6% respectivamente (menores a 10%) (Anexo 1).

En el cuadro 3, podemos observar los resultados del análisis de regresión logística para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras según estación de parto, paridad y nivel de calcio en los establos lecheros de Lima. Según los resultados, las vacas primíparas presentan 8 veces mayor riesgo de presentación de endometritis comparado

con las vacas multíparas ajustado a estación del año y al nivel de calcio (IC al 95%; 3.205 a 20.350; $p<0.05$). Las vacas que presentaron niveles de calcio por debajo de 7.44 mg/dl presentaron 2.6 veces mayor riesgo de presentación de endometritis comparado con las vacas que presentaron niveles de calcio por encima de este valor ajustado a paridad y estación del año (IC al 95%; 1.345 a 4.951; $p<0.05$). Así mismo, las vacas que parieron en invierno presentaron 2.4 veces mayor riesgo de presentar endometritis comparado con las vacas que parieron en verano ajustado a paridad y nivel de Calcio (IC al 95%; 1.035 a 5.374; $p<0.05$).

Cuadro 3. Resultados del análisis de regresión logística para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras según estación de parto, paridad y nivel de calcio en los establos lecheros de Lima.

	Error			OR	Intervalo de	
	B	estándar	Sig.	ajustado	confianza al 95%	
Estación del año	0.858	0.420	0.041	2.358	1.035	5.374
Paridad	2.089	0.472	0.000	8.076	3.205	20.350
Nivel de calcio	0.948	0.332	0.004	2.581	1.345	4.951
Constante	-1.016	0.437	0.020	0.362		

En el cuadro 4 se presentan valores pronósticos, odds pronosticado, e intervalo de confianza al 95% según el modelo de regresión logística obtenido para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras en los establos de Lima. Se puede observar que el grupo de animales con mayor chance de presentar endometritis fueron las vacas primíparas que parieron en invierno y que presentaron niveles de calcio sérico mayores que 7.44 mg/dl (Odds pronosticado =17.79), con endometritis pronosticado de

94.68%. El siguiente grupo de animales con mayor chance de presentar endometritis fueron las vacas primíparas que parieron en verano y que presentaron niveles de calcio sérico menores que 7.44 mg/dl (Odds pronosticado = 7.55), con endometritis pronosticado de 88.3%. Así mismo, las vacas multíparas que parieron en verano y que presentaron niveles de calcio sérico mayor que 7.44 mg/dl, fueron el grupo de animales con menor chance de presentar endometritis (Odds pronosticado = 0.36), con endometritis pronosticado de 26.58%.

Cuadro 4. Valor pronóstico, odds, % de endometritis e intervalo de confianza al 95% según el modelo de regresión logística obtenido para el riesgo de presentación de endometritis de las vacas lecheras en los establos de Lima.

Estación del año	Paridad	Nivel de calcio	Odds	% de endometritis	IC al 95%
Invierno	Primíparas	Menor que 7.44 mg/dl	17.79	94.68% ^a	86.99% - 97.93%
		Mayor que 7.44 mg/dl	6.89	87.33% ^b	70.70% - 95.17%
	Multíparas	Menor que 7.44 mg/dl	2.20	68.78% ^c	62.65% - 74.31%
		Mayor que 7.44 mg/dl	0.85	46.05% ^d	27.58% - 65.68%
	Primíparas	Menor que 7.44 mg/dl	7.55	88.30% ^b	75.78% - 94.79%
		Mayor que 7.44 mg/dl	2.92	74.52% ^c	52.84% - 88.41%
Verano	Multíparas	Menor que 7.44 mg/dl	0.93	48.30% ^d	38.67% - 58.06%
		Mayor que 7.44 mg/dl	0.36	26.58% ^e	13.33% - 46.00%

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

Las vacas primíparas que parieron en invierno y que presentaron niveles de calcio sérico menores que 7.44 mg/dl durante la primera semana post parto presentan mayor riesgo de presentación de endometritis en comparación con las vacas multíparas que parieron en verano y que presentan valores de calcio sérico mayores que 7.44 mg/dl

durante la primera semana post parto. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la hipocalcemia subclínica ($\text{Ca} < 7.44 \text{ mg/dl}$) durante la primera semana post parto es un factor de riesgo importante en la presentación de endometritis en vacas lecheras.

V. DISCUSIÓN

En la primera parte del estudio se realizó el análisis ROC con la finalidad de determinar el punto de corte del nivel de calcio sérico relacionado a la presentación de endometritis. El punto de corte encontrado fue de 7.44 mg/dl y representa el punto de mayor riesgo para la presentación de endometritis en las vacas lecheras.

Según este punto de corte, se determinó que las vacas que presentan niveles de calcio sérico menores que 7.44 mg/dl en la primera semana post parto tienen 1.78 veces mayor riesgo de presentar endometritis en comparación con las vacas que presentan niveles de calcio sérico mayores que 7.44 mg/dl en la primera semana postparto (OR=1.78; 95% IC 0.98-3.23). Estos resultados pueden ser debido a que en la etapa post parto la vaca lechera se enfrenta a una serie de desafíos propios de la etapa de transición. Sin embargo, existen factores que podrían estar solapando el verdadero resultado.

Por tal motivo, se evaluaron cada una de las variables y se determinaron las que debían considerarse en el estudio. Para tal caso, se realizó la selección de variables significativas mediante el método de selección de variables de eliminación hacia atrás. Como

consecuencia se eliminaron las variables “sexo de la cría” y “establo”, las cuales no fueron significativas en el modelo (mayor al 10%). Finalmente, las variables consideradas dentro del modelo de regresión logística fueron: estación del año, paridad y nivel de calcio.

Los resultados obtenidos del análisis del modelo de regresión logística demuestran que las vacas que parieron en invierno tienen un mayor riesgo de presentar endometritis comparado con las vacas que parieron en verano (OR=2.36; 95% IC 1–5.4). Estos resultados no coinciden con estudios realizados por otros autores, quienes no encontraron una relación directa entre la temporada de parto y la presentación de endometritis (Kim y Kang, 2003; Carneiro *et al.*, 2014). Sin embargo, Adnane *et al.* (2017) consideran que las divergencias encontradas pueden explicarse por los diferentes criterios diagnósticos, así como las diferentes condiciones climáticas entre los estudios. Principalmente, la temperatura promedio de los lugares donde se realizaron los estudios.

A su vez, estudios mencionan que el grado de contaminación del ambiente es uno de los factores de riesgo relacionados a la presentación de enfermedades uterinas en los hatos lecheros (Sheldon y Dobson, 2004; Bell y Roberts, 2007). Por lo tanto, una condición probable que podría explicar el mayor riesgo de presentación de endometritis en los meses de invierno es el aumento de la humedad de la cama y la consiguiente proliferación de microorganismos como fuente de contaminación.

De otro modo, se encontró que las vacas primíparas presentaron mayor riesgo de padecer endometritis con respecto a las vacas multíparas (OR=8.08; 95% IC 3.2-20.3). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Bruun *et al.*, (2002) donde se sostiene que la paridad es un factor de riesgo para la presentación de enfermedades uterinas. Esto podría deberse a que las primíparas tienen mayor riesgo de presentar

distocia comparadas con las vacas multíparas (Bruun *et al.*, 2002), lo cual también es considerado como factor de riesgo en la presentación de las enfermedades uterinas (Sheldon y Dobson, 2004; Bell y Roberts, 2007, Adnane *et al.*, 2017). A su vez, las vacas multíparas podrían tener cierto grado de resistencia inmunológica contra la infección uterina, debido a que tuvieron más episodios previos de contaminación bacteriana (Adnane *et al.*, 2017). Entonces, la exposición previa limitada en las vacas primíparas podría estar retrasando la respuesta inmune, lo que resulta en la persistencia de la contaminación y el consiguiente establecimiento de la endometritis.

Contrariamente, estudios realizados por Carneiro *et al.* (2014) y Giuliadori *et al.* (2013) informaron que la paridad no afectó la incidencia de la presentación de endometritis. Esto se explica probablemente porque estos estudios consideraron también otros factores de riesgo relacionados al déficit del balance energético probablemente anidados dentro de la variable paridad. Se sabe que después del parto todas las vacas lecheras experimentan un periodo de balance energético negativo, debido a las altas demandas energéticas necesarias para la síntesis de leche y calostro (Mathis y Shoelson, 2011; Reinhardt *et al.*, 2010; Bromfield *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que la paridad está relacionada a la magnitud del déficit del balance energético negativo (Wathes *et al.*, 2007). Esto se puede explicar debido a que las vacas que se acercan a su primer parto están en un estado metabólico diferente al experimentado por las vacas multíparas, puesto que requieren nutrientes para su propio crecimiento y para el desarrollo del feto (Coffey *et al.*, 2006). De modo que, el efecto del balance energético negativo es una razón probable para explicar el mayor riesgo de presentación de endometritis en vacas primíparas comparado con vacas multíparas determinado en el presente estudio.

Finalmente, se determinó que las vacas con niveles de calcio sérico menores que 7.44 mg/dl presentan 2.6 (95% IC 1.34-4.9) veces más riesgo de presentación de endometritis con respecto a vacas con niveles de calcio sérico mayores que 7.44 mg/dl en la primera semana post parto. Se conoce que en el post parto temprano, se genera un importante incremento de la demanda de energía y calcio como consecuencia de la producción de calostro y leche (Bell, 1995; Goff, 2008; Reinhardt *et al.*, 2010). A pesar de ellos, la vaca lechera en esta etapa presenta una marcada disminución de la ingesta de materia seca, lo cual deviene en un balance energético negativo (Butler y Smith, 1989; Bell, 1995), así como en la reducción de las concentraciones plasmáticas de calcio (Goff, 2008; Reinhardt *et al.*, 2010).

El calcio al ser un componente importante de los sistemas mensajeros celulares, es necesario para la regulación de una serie de importantes procesos fisiológicos, descritos en la revisión bibliográfica (Saris y Carafoli, 2005; Parekh, 2006; Vig y Kinet, 2009, Bisinotto *et al.*, 2012). De este modo, el papel relevante del calcio en procesos fisiológicos como la contracción muscular y la respuesta inmune (Mateus y Lopes da Costa, 2002; Bisinotto *et al.*, 2012; Hammon *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2011) podrían explicar los resultados obtenidos. Debido a que las concentraciones adecuadas de calcio permite la eficiente contracción del miometrio, el cual promueve la depuración de loquios en el período postparto (Mateus y Lopes da Costa, 2002; Bisinotto *et al.*, 2012) mediante un mecanismo de arrastre y expulsión de fluidos (Senger, 2008; Azawi, 2008). Además de permitir la adecuada activación de los neutrófilos, los cuales actúan como mecanismo inmune predominante de defensa temprana en el útero en involución (Hammon *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2011).

Algunos estudios evidencian la relación entre los bajos niveles de calcio y alteraciones reproductivas en el ganado. Por ejemplo, Risco *et al.* (1994), reportaron que las vacas que tienen periodos de involución uterina más prolongados (entre 15 y 32 días) presentan menores niveles de calcio sérico en comparación con vacas lecheras con periodos de involución uterina menos prolongados. Así mismo, Kamgarpour *et al.* (1999) reportaron que el intervalo desde el parto hasta completar la involución uterina se correlacionó negativa y significativamente con las concentraciones medias de Ca sérico. Mientras que, otro estudio determinó que por cada 1 mg/dl mayor de Ca sérico se reduce en un 22% el riesgo relativo de desarrollar enfermedades uterinas como la metritis (Martínez *et al.*, 2012).

Por otro lado, Kim y Kang (2003) señalan que los trastornos metabólicos, incluyendo la hipocalcemia, afectan significativamente la presentación de la endometritis clínica (OR= 3,5; 95% IC 1.1-10.8). Existiendo también estudios de otros autores que no encontraron una asociación entre la presentación de hipocalcemia clínica y la presentación de enfermedades uterinas como metritis o endometritis (Dubuc *et al.*, 2010b, Cheong *et al.*, 2011).

Si bien la endometritis es una enfermedad multifactorial y resulta de la interacción de muchos factores intrínsecos y extrínsecos, es muy importante la identificación de la hipocalcemia subclínica como factor de riesgo para su presentación. Debido a esto, las medidas que se tomen para la prevención de la hipocalcemia subclínica también permitirán la presentación de otras enfermedades asociadas a los niveles bajos de calcio tal como la endometritis. A su vez, la reducción de costos asociados a esta alteración,

tales como ineficiencia reproductiva, sacrificio, costos de tratamiento, entre otros (Esposito *et al.*, 2014).

Una de las medidas que se realizan en la prevención de la presentación de hipocalcemia es la adición de sales aniónicas a la dieta preparto, la cual tiene un efecto en el pH del organismo al modificar la diferencia catión aniónico dietario (Tucker *et al.*, 1992; Goff y Horst, 1997). Sin embargo, un estudio realizado en hatos lecheros de la provincia de Lima ha demostrado que no se realiza un adecuado manejo de las sales aniónicas (Guzmán *et al.*, 2016). Es necesario que los ganaderos tengan un plan que permita la implementación adecuada de medidas de prevención.

Cabe mencionar que este trabajo es el primer estudio que evalúa la relación del nivel de calcio con la presentación de endometritis en establos lecheros de la costa de Lima. Estos resultados muestran parte del estado en el que se encuentran los establos lecheros de Lima y proporcionan información más acertada comparada con otros estudios realizados en lugares con características ajenas a nuestra realidad. El conocimiento de la relación entre los bajos niveles de calcio y la presentación de endometritis permitirá que el ganadero adopte nuevas técnicas y genere mejoras que en el tiempo favorezcan el desempeño reproductivo, productivo y sanitario del hato lechero.

VI. CONCLUSIONES

1. La hipocalcemia subclínica ($\text{Ca} < 7.44 \text{ mg/dl}$) durante la primera semana post parto es un factor de riesgo para la presentación de endometritis en vacas lecheras (OR 2.58; IC 95%, 1.35 - 4.95).
2. Las vacas primíparas tienen mayor riesgo de presentar endometritis comparado con las vacas multíparas (OR 8.07; IC 95%, 3.2 - 20.35).
3. Las vacas que paren en invierno tienen mayor riesgo de presentar endometritis comparado con las vacas que paren en verano (OR 2.36; IC 95%, 1.04 - 5.37).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adnane M, Kaidi R, Hanzen Ch, England G. 2017. Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: A review. *Turk J Vet Anim Sci* 41: 1-11
2. Allen B, Walsh M. 1994. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. Volume 19, Issue 9, p362–368
3. Andresen H. 2001. Vacas secas y en transición. *Rev Inv Vet, Peru* 12(2): 36- 49.
4. Azawi O. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Ani Reprod Sicence* 105:187-208.
5. Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B. 1985. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab. Invest.* 52, 151–158.
6. Bajcsy A, Szenci O, Doornenbal A, Van der Weijden G, Csorba C, Kocsis L, Szucs I, Ostgard S, Taverne M. 2005. Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology* 64, 99–111.

7. Bankers-Fulbright J, Kephart G, Bartemes K, Kita H, O'Grady S. 2004. Platelet-activating factor stimulates cytoplasmic alkalization and granule acidification in human eosinophils. *J. Cell Sci.* 117, 5749–5757.
8. Barlund C, Carruthers T, Waldner C, Palmer C. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69:714–723.
9. Bartolome J, Archbald L. 2011. Reproductive management in dairy cows. En: Risco C, ed. *Dairy production medicine*. Iowa: John Wiley & Sons, Inc. p. 73-79.
10. Battistini V. 1958. Estudio sobre algunos aspectos relativos a la reproducción del ganado Holstein en el establo de Maranga. Tesis para optar el grado de bachiller. Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 96 p.
11. Beede D. 2005. Formulation of rations with optimal cations and anions for lactation. In: *Proc Tri-State Dairy Nutrition Conference*. Fort Wayne, Indiana, USA.
12. Bell A. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 73: 2804–2819.
13. Bell M, Roberts D. 2007. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 68: 1074-1079.
14. Bers D. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198–205.
15. Bicalho M, Lima F, Machado V, Meira E, Ganda E, Foditsch C, 2015. Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis and pregnancy outcomes in dairy cows. *Theriogenology*. 2016 Jan 15; 85(2):267-74.
16. Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Martinez N, Lima F, Staples C, Thatcher W, Santos J. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Anim Reprod.* 9(3): 260-272.

17. Bondurant R. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* 77:101–10.
18. Bonnett B, Martin S, Gannon V, Miller R, Etherington W. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows, III: bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res* 1991; 55:168–173.
19. Borsberry S, Dobson H. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec* 1989; 124:217–219.
20. Boulay F, Naik N, Giannini E, Tardif M, Bouchon L. 1997. Phagocyte chemoattractant receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 832, 69–84.
21. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss D, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
22. Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 577–582.
23. Bromfield J, Santos J, Block J, Williams R, Sheldon I. 2015. Physiology and endocrinology symposium: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow *J. Anim. Sci.* 2015.93:2021–2033.
24. Bruun J, Ersboll A, Alban L. 2002. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev Vet Med* 2002; 54: 179-190.
25. Burgos R, Conejeros I, Hidalgo M, Werling D, Hermosilla C. 2011. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines *Vet Immunol Immunopathol.* 143: 1– 10

26. Burgos R, Hidalgo M, Figueroa C, Conejeros I, Hancke J. 2009. New potential targets to modulate neutrophil function in inflammation. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 153–168.
27. Butler W, Smith R. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72:767–783.
28. Callahan C, Horstman L. 1993. Treatment of postpartum metritis in dairy cows caused by *Actinomyces pyogenes*. *Bovine Pract.* 27:162–165.
29. Caraviello D, Weigel K, Craven M, Gianola D, Cook N, Nordlund K, Fricke P, Wiltbank M. 2006. Analysis of reproductive performance of lactating cows on large dairy farms using machine learning algorithms. *J Dairy Sci.* 89(12): 4703-4722.
30. Carneiro L, Ferreira A, Padua M, Saut J, Ferraudo A, Dos Santos R. 2014. Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46: 1435-1439.
31. Catterall W. 2011. Voltage Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3 (8):a003947.
32. Chamberlin W, Middleton J, Spain J, Johnson G, Ellersieck M, Pithua. 2013. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:7001–7013.
33. Chapinal N, Carson M, LeBlanc S, Leslie K, Godden S, Capel M, Santos J, Overton M, Duffield T. 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci.* 95: 1301-1309.

34. Cheong S, Nydam D, Galvao K, Crosier B, Gilbert R. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2011; 94: 762-770.
35. Cheong S, Nydam D, Galvão K, Crosier B, Ricci A, Caixeta L, Sper R, Fraga M, Gilbert R. 2012. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 77:858-864.
36. Coffey M, Hickey J, Brotherstone S. 2006. Genetic aspects of growth of Holstein–Friesian dairy cows from birth to maturity. *J Dairy Sci* 2006; 89: 322–9.
37. Conejeros I, Jara E, Carretta M, Alarcon P, Hidalgo M, Burgos R, 2010. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) reduces respiratory burst, MMP-9 release and CD11b expression, and increases l-selectin shedding in bovine neutrophils. *Res Vet Sci*. 2012 Feb;92(1):103-10.
38. Costanzo L. 2000. Fisiología. McGraw-Hill Interamericana. Ed 2000. México. p 32-42.
39. Dahlgren C, Johansson A, Lundqvist H, Bjerrum O, Borregaard N. 1992. Activation of the oxygen-radical-generating system in granules of intact human neutrophils by a calcium ionophore (ionomycin). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research* 1137, 182–188.
40. De Boer M, LeBlanc S, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, Gilbert R, McDugall S. 2014. Invited review. Systematic review of diagnostic tests for reproductive tract infection and inflammation in dairy cows. *J Dairy Sci.*; 97(7):3983-99.
41. Dohmen M, Joop K, Sturk A, Bols P, Lohuis J. 2000. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of

- endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 2000; 54:1019–1032.
42. Dohmen M, Lohuis J, Huszenicza G, Nagy P, Gacs M. 1995. The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology* 1995;43: 1379-1388.
43. Dore M, Slauson D, Suyemoto M, Neilsen N. 1990. Calcium mobilization in C5a-stimulated adult and newborn bovine neutrophils. *Inflammation* 14, 71–82.
44. Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin H, Kutzer P. 2001. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84:2010–7.
45. Drillich M, Kaufmann T, Raab D, Lenz M, Heuwieser W. 2004. Comparison of new techniques for the diagnosis of chronic endometritis in dairy cattle. In: Poster abstract, the proceedings of the World Buiatrics Congress; 2004. p 42.
46. Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. 2010a. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5225-33.
47. Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. 2010b. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J Dairy Sci* 93: 5764-5771.
48. Duffield T. 2006. Minimizing Subclinical Metabolic Diseases in Dairy Cows. *WCDS Advances in Dairy Technology* 18:43-55
49. Durani P, Leaper D. 2008. Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *International Wound Journal* 5: 376–387.
50. Esposito G, Irons P, Webb E, Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 30;144(3-4):60-71.

51. Ferguson J. 1995. La reproducción en hatos lecheros. Rev. Hoard's. Diciembre. p 1138.
52. Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JACM, Cox P, Huszenicza G. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science* 96: 265-281.
53. Fonseca F, Britt J, McDaniel B, Wilk J, Rakes A. 1983. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1128–1147.
54. Fourichon C, Seegers H, Malher X. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: ameta-analysis. *Theriogenology* 53, 1729–1759
55. Fuchs T, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241.
56. Gende O. 2003. Capacitative calcium influx and intracellular pH crosstalk in human platelets. *Platelets* 14, 9–14.
57. Gennaro R, Dewald B, Horisberger U, Gubler H, Baggiolini M. 1983. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.* 96, 1651–1661.
58. Gilbert R, Grohn Y, Miller P, Hoffman D. 1993. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*; 36:75–82.
59. Gilbert R, Shin S, Guard C, Erb H, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*; 64: 1879–88.

60. Giuliadori M, Magnasco R, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido I, Risco C, De la Sota R. 2013. Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: Risk factors and reproductive efficiency. *J. Dairy Sci.* 96:210–218
61. Goff J, Horst R. 1997. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 176- 186.
62. Goff J. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal* 176, 50–57.
63. Goff J. 2010. En Smith B. *Medicina Interna de grandes animales*. 4 ed. El Sevier p 1369-1373.
64. Granfeldt D, Samuelsson M, Karlsson A. 2002. Capacitative Ca^{2+} influx and activation of the neutrophil respiratory burst. Different regulation of plasma membrane- and granule-localized NADPH-oxidase. *J. Leukoc. Biol.* 71, 611–617.
65. Griffin J, Hartigan P, Nunn W. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility, I: infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1974; 1:91–106.
66. Guyton A, Hall J. 2008. *Tratado de Fisiología Médica*. 12° Ed. 2008.
67. Guzmán A, Montoya B, Gómez C. 2016. Determinación del Balance Cation Anión Dietario en Vacas de Parto en Establos Lecheros de Lima y Trujillo, Perú, y su Relación con el pH Urinario. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(4): 698-705
68. Hallett M, Davies E, Campbell A. 1990. Oxidase activation in individual neutrophils is dependent on the onset and magnitude of the Ca^{2+} signal. *Cell Calcium* 11, 655–663.

69. Hammon D, Evjen I, Dhiman T, Goff J, Walters J. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol.* 113(1-2): 21-9.
70. Harris D. 1981. Factors predisposing to parturient paresis. *Australian Vet. J.*,57:357-361
71. Heppelmann M, Weinert M, Brömmeling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. 2013. The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Anim Reprod Sci* 2013; 143: 1–7.
72. Heppelman M, Krach K, Krueger L, Benz P, Herzog K, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. 2015. The effect of metritis and subclinical hypocalcemia on uterine involution in dairy cows evaluated by sonomicrometry. *J Reprod Dev.* 2015 Dec; 61(6): 565–569.
73. Herath S, Dobson H, Bryant C, Sheldon I. 2006. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *Journal of Reproductive Immunology* 69: 13-22.
74. Heuwieser W, Tenhagen B, Tischer M, Luhr J, Blum H. 2000. Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. *Vet Rec.*;146 (12):338-41.
75. Hidalgo M, Ojeda F, Eyre P, LaBranche T, Smith C, Hancke J, Burgos R. 2004. Platelet-activating factor increases pH(i) in bovine neutrophils through the PI3K-ERK1/2 pathway. *Br. J. Pharmacol.* 141, 311–321.
76. Hill A, Frost A, Brooker B. 1984. Progressive pathology of severe *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 37, 179–187.

77. Hill D, Wener M, Heppner T, Nelson M. 2011. Calcium Signaling in Smooth Muscle. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(9): a004549.
78. Horst R, Goff J, McCluskey B. 2003. Prevalence of subclinical hypocalcemia in U.S. dairy operations. J Dairy Sci 2003; 86:247 Suppl 1.
79. Kamgarpour R, Daniel R, Fenwick D, Mcguigan K, Murphy G. 1999. Postpartum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. Vet. J. 158: 59-67.
80. Kamimura S, Ohgi T, Takahashi M, Tsukamoto T. 1993. Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. J Vet Med Sci 1993; 55: 643–647.
81. Kankaanranta H, Moilanen E, Lindberg K, Vapaatalo H. 1995. Pharmacological control of human polymorphonuclear leukocyte degranulation by fenamates and inhibitors of receptor-mediated calcium entry and protein kinase C. Biochem. Pharmacol. 50, 197–203.
82. Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K, Walton J. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology;62:9–23.
83. Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K, Walton J. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. Can Vet J;46: 255–9.
84. Kim I, Kang H. 2003. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. J Reprod Dev 2003; 49:485–491.

85. Kimura K, Reinhardt T, Goff J. 2006. Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 89(7): 2588–2595.
86. Kindahl H, Bekana M, Kask K, Königsson K, Gustafsson H, Odensvik K. 1999. Endocrine aspects of uterine involution in the cow. *Reprod Dom Anim* 34: 261-268.
87. Lacy P. 2006. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2006; 2(3): 98–108.
88. Lambertz C, Völker D, Janowitz U, Gauly M. 2014. Evaluation of vaginal discharge with the Metrichheck device and the relationship to reproductive performance in postpartum dairy cows. *Anim Sci*. 85(9):848852.
89. LeBlanc S, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe G, Walton J, Johnson W. 2002a. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 2237–2249.
90. LeBlanc S, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe G, Walton J, Johnson W. 2002b. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 2223–2236.
91. LeBlanc S, Osawa T, Dubuc J. 2011. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 76, 1610–1618.
92. Leutert C, Suthar V, Heuwieser W. 2013. Evaluation of transrectal examination of cervical diameter by palpation in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2013 Feb; 96(2):1063-70.
93. Lew P, Monod A, Waldvogel F, Dewald B, Baggiolini M, Pozzan T. 1986. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J. Cell Biol*. 102, 2197–2204.
94. Lewis G. 1997. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci*. 80, 984–994.

95. Machado V, Knauer W, Bicalho M, Oikonomou G, Gilbert R, Bicalho R. 2012a. A novel diagnostic technique to determine uterine health of holstein cows at 35 days postpartum. *J. Dairy Sci.*;95(3):1349-57.
96. Machado V, Oikonomou G, Bicalho M, Knauer W, Gilbert R, Bicalho R. 2012b. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol*; 159(3-4):460-9.
97. Markusfeld O. 1987. Periparturient traits in seven high dairy herds: incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J Dairy Sci*; 70:158–166.
98. Martinez N, Risco C, Lima F, Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Maunsell F, Galvão K, Santos J. 2012. Evaluation of periparturient calcium status energetic profile and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci*, 95(12):7158-72.
99. Martin-Requero A, Daza F, Hermida O, Butta N, Parrilla R. 1997. Role of Ca²⁺ and protein kinase C in the receptor-mediated activation of Na⁺/H⁺ exchange in isolated liver cells. *Biochem. J* 325 (3), 631–636.
100. Mateus L, Lopes da Costa L. 2002. Peripartum blood concentrations of calcium, phosphorus and magnesium in dairy cows with normal puerperium or puerperal endometritis. *RPCV* 97 (541) 35-38.
101. Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P, Ziecik AJ. 2003. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE₂ and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci* 2003; 76:143–154.
102. Mathis D, Shoelson S. 2011. Immunometabolism: An emerging frontier. *Nat. Rev. Immunol.* 11:81.

103. McDougall S, Macaulay R, Compton C. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 99: 923.
104. Mickelsen WD, Paisley LG, Anderson PB. 1986. Survey of the prevalence and types of infertility in beef cows and heifers. *J Am Vet Med Assoc* 1986;1:51–4.
105. Miller H, Kimsey P, Kendrick J, Darien B, Doering L, Franti C. 1980. Endometritis of dairy cattle: diagnosis, treatment and fertility. *Bovine Pract* 1980;15:13–23.
106. Monk P, Partridge L, 1993. Characterization of a complement fragment- C5a-stimulated calcium-influx mechanism in U937 monocytic cells. *Biochem. J* 295 (3), 679–684.
107. Morrow D, Roberts S, McEntee K, Gray H. 1966. Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1966; 149: 1596–1609.
108. Mulligan F, Grady L, Rice D, Doherty M. 2006. Production diseases of the transition cow: Milk fever and subclinical hypocalcaemia. *Irish Veterinary Journal.* 59 (12).
109. Mulligan F, Doherty M. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet J.*; 176:3-9.
110. Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.
111. Niessen H, Kuijpers T, Roos D, Verhoeven A. 1991. Release of azurophilic granule contents in fMLP-stimulated neutrophils requires two activation signals, one of which is a rise in cytosolic free Ca^{2+} . *Cell. Signal.* 3, 625–633.
112. Noakes D, Wallace L, Smith G. 1990. Pyometra in a Friesian heifer: bacteriological and endometrial changes. *Vet Rec* 1990; 126:509.
113. Noakes D, Parkinson T, England G, Arthur G. 2001. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics.* 8^a ed. USA: Saunders-Elsevier. 868p

- 114.Opsomer G, Gröhn Y, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53, 841–857.
- 115.Orrego J, Delgado A, Echevarría L. 2003. Vida productiva y principales causas de descarte de vacas Holstein en la cuenca de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 14: 68-73.
- 116.Ortiz D. 2006. Índices reproductivos del ganado vacuno en la Cuenca Lechera de Lima. Tesis para optar el grado de bachiller. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- 117.Osaki M, Sumimoto H, Takeshige K, Cragoe E, Hori Y, Minakami S. 1989. Na⁺/H⁺ exchange modulates the production of leukotriene B₄ by human neutrophils. *Biochem. J* 257, 751–758.
- 118.Palić D, Andreassen C, Ostojić J, Tell R, Roth J. 2007. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J. Immunol. Methods* 319, 87–97.
- 119.Palmer C. 2014. Postpartum uterine infection en Hopper R: *Bovine Reproduction*. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. p 440–8.
- 120.Parekh A, Putney J. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810.
- 121.Pértegas S, Pita S. 2002. Cálculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. *CAD ATEN PRIMARIA* 2002; 9: 148-150.
- 122.Rausch P, Moore T. 1975. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. *Blood* 46, 913–919.
- 123.Reinhardt T, Lippolis J, McCluskey B, Goff J, Horst R. 2010. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal* 188 (2011) 122–124.

- 124.Reuter H. 1979. Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* 41: 413–424.
- 125.Reyes J, Zarain A. 2006. Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. Vol. *Archivos de Cardiología de México*. 76 Supl. 4/Oct-Dic. 2006:S4, 18-32
- 126.Ribeiro E, Lima F, Greco L, Bisinotto R, Monteiro A, Favoreto M, Ayres H, Marsola R, Martinez N, Thatcher W, Santos J. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J. Dairy Sci.* 96:5682–5697.
- 127.Rinaudo A. 2012. Endometritis Subclínica en vacas lecheras: Diagnóstico, tratamiento e incidencia productiva y reproductiva. Tesis para optar el grado de doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- 128.Risco C, Drost M, Thatcher W, Savio J, Thatcher M. 1994. Effects of calvingrelated disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 42: 183-203.
- 129.Risco C, Hernández J. 2003. Comparison of cetiofur hydrochloride and estradiol cypionate fir metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. *Theriogenology* 60:47-58.
- 130.Roberts T, Chapinal N, LeBlanc S, Kelton D, Dubuc J, Diffield T. 2012. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J Dairy Sci.*; 95(6):3057-63.
- 131.Roos A, Boron W. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61, 296–434.

132. Runciman D, Anderson G, Malmo J. 2009. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalixin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 2009;87(9):369-78.
133. Salazar A. 1993. Parámetros reproductivos y observación de celos en la cuenca lechera de Lima. Tesis para optar el grado de bachiller. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 47 p.
134. Salido G. 1996. Sistema Digestivo en García A, Catejón F, De la Cruz L, González J, Murillo M, Salido G. *Fisiología Veterinaria*. McGraw – Hill Interamericana. 599-618.
135. Salmon M, Ahluwalia J. 2010. Discrimination between receptor- and store-operated Ca^{2+} influx in human neutrophils. *Cell. Immunol.* 265, 1–5.
136. Sandoval A, Riquelme J, Carretta M, Hancke J, Hidalgo M, Burgos R. 2007. Store-operated calcium entry mediates intracellular alkalization, ERK1/2, and Akt/PKB phosphorylation in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1266–1277.
137. Sandoval R, 2016. Determinación de la tasa de servicio y de los factores que la afectan en los establos lecheros intensivos del departamento de Lima. Tesis para optar el grado de magister en Producción y Reproducción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 62 p.
138. Saris N, Carafoli E. 2005. A historical review of cellular calcium handling with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* 70: 187–194.
139. Schaff U, Yamayoshi I, Tse T, Griffin D, Kibathi L, Simon, S. 2008. Calcium flux in neutrophils synchronizes beta2 integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment. *Ann. Biomed. Eng.* 36, 632–646.
140. Segal A. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223.

- 141.Senger P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2^a ed. Estados unidos: Currentconception Inc. 373 p.
- 142.Sheldon I, Noakes D. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Veterinary Record* 142: 575-579.
- 143.Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Pfeiffer D, Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123, 837–845.
- 144.Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Dobson H. 2003. The effect of intrauterine asministration of estradiol on postpartum uterion involution in cattle. *Theriogenology* 59: 1357-1371.
- 145.Sheldon I. 2004. The postpartum uterus. *Vet Clin Food Anim* 20: 569–591
- 146.Sheldon I, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science* 82-83: 295-306.
- 147.Sheldon I, Lewis G, LeBlanc S, Gilbert R. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516–1530.
- 148.Sheldon I, Williams E, Miller A, Nash D, Herath S. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008; 176:115–21.
- 149.Silva D, Delgado A, Evaristo R, Falcón N. 2011. Frecuencia de presentación del desplazamiento de abomaso a la izquierda en vacas lecheras de la cuenca de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 2011; 22 (4): 403-406.
- 150.Simchowitz L. 1985. Chemotactic factor-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in human neutrophils. II. Intracellular pH changes. *J. Biol. Chem.* 260, 13248–13255.
- 151.Simchowitz L, Cragoe E. 1986. Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. *J. Biol. Chem.* 261, 6492–6500.

152. Smith J. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672–686.
153. Steinckwich N, Fripiat J, Stasia M, Erard M, Boxio R, Tankosic C, Daignon I, Nüsse O. 2007. Potent inhibition of store-operated Ca^{2+} influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. *J. Leukoc. Biol.*
154. Tarlowe M, Kannan K, Itagaki K, Adams J, Livingston D, Hauser C. 2003. Inflammatory chemoreceptor cross-talk suppresses leukotriene B₄ receptor 1-mediated neutrophil calcium mobilization and chemotaxis after trauma. *J. Immunol.* 171, 2066–2073.
155. Trevani A, Andonegui G, Giordano M, Lopez D, Gamberale R, Minucci F, Geffner J. 1999. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J. Immunol.* 162, 4849–4857.
156. Tsien R. 1983. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45: 341–358.
157. Tucker W, Hogue J, Adams G, Aslam M, Shin I, Morgan G. 1992. Influence of dietary cation-anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess calcium. *J Anim Sci* 70: 1238-1250.
158. Vig M, Kinet J. 2009. Calcium signaling in immune cells. *Nat. Immunol.* 10: 21–27.
159. Vollema A, Groen A. 1996. Genetic parameters of longevity traits of an upgrading population of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79: 2261- 2267.
160. Wagner D, BonDurant R, Sisco W. 2002. Reproductive effects of estradiol cypionate in parturient dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 219:220-223.

161. Walsh M. 2011. Vascular Smooth Muscle Myosin Light Chain Diphosphorylation. mechanism function and pathological implications. *IUBMB Life*, 63(11): 987–1000.
162. Wathes D, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris D, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68S S232–S241.
163. Westermann S, Drillich M, Kaufmann T, Madoz L, Heuwieser W. 2010. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* 2010;74(7):1248-55.
164. Williams E, Fischer D, Pfeiffer D, England G, Noakes D, Dobson H. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 2005; 63:102–17.
165. Youngquist R, Shore M. 1997. Postpartum uterine infections en: Youngquist R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 1° Ed W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA; 1997:335–340.
166. Youngquist R y Threlfael W. 2007. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2° ed. Saunders. Philadelphia. 360- 362.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Determinación de las variables independientes significativas de las variables en la ecuación mediante el método de selección de variables de eliminación hacia atrás.

		B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1	EST			1.913	2	0.384			
	EST(1)	-0.467	0.387	1.454	1	0.228	0.627	0.294	1.339
	EST(2)	0.037	0.385	0.009	1	0.924	1.037	0.487	2.207
	EST_A(1)	1.047	0.444	5.552	1	0.018	2.848	1.192	6.802
	PAR(1)	2.085	0.491	18.012	1	0.000	8.044	3.071	21.068
	SEX(1)	-0.222	0.315	0.495	1	0.482	0.801	0.432	1.486
	CaROC(1)	0.829	0.353	5.518	1	0.019	2.292	1.147	4.578
	Constante	-0.871	0.465	3.506	1	0.061	0.418		
Paso 2	EST			1.679	2	0.432			
	EST(1)	-0.434	0.384	1.279	1	0.258	0.648	0.305	1.375
	EST(2)	0.028	0.385	0.005	1	0.943	1.028	0.483	2.187
	EST_A(1)	1.000	0.438	5.217	1	0.022	2.719	1.153	6.417
	PAR(1)	2.019	0.480	17.681	1	0.000	7.533	2.939	19.307
	CaROC(1)	0.847	0.353	5.773	1	0.016	2.333	1.169	4.655
	Constante	-0.956	0.449	4.538	1	0.033	0.384		
Paso 3	EST_A(1)	0.858	0.420	4.167	1	0.041	2.358	1.035	5.374
	PAR(1)	2.089	0.472	19.627	1	0.000	8.076	3.205	20.350
	CaROC(1)	0.948	0.332	8.134	1	0.004	2.581	1.345	4.951
	Constante	-1.016	0.437	5.416	1	0.020	0.362		